

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocyttaire humaine THP-1

Wanet, Anaïs

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs
induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocyttaire
humaine THP-1**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Anaïs WANET

Janvier 2011

Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocyttaire humaine THP-1

WANET Anaïs

Résumé

Les miRNAs jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques et l'identification de leurs cibles moléculaires ne cesse de progresser. En revanche, les mécanismes contrôlant leur propre expression sont moins bien connus.

Nous nous sommes intéressés au miR-132, induit dans des monocytes et macrophages en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS. L'objectif de ce mémoire consistait en l'étude des mécanismes responsables de l'induction de ce miRNA dans les cellules THP-1 stimulées par le LPS. Le gène codant pour le miR-132 est localisé à proximité du miR-212, pour lequel aucun lien n'avait été établi avec le LPS avant ce travail. Nous avons tout d'abord démontré que ces 2 miRNAs étaient transcriptionnellement induits en réponse au LPS sous forme d'un même pri-miRNA. Afin d'identifier les facteurs de transcription responsables de cette induction, nous avons développé trois types d'approches. Nous avons tout d'abord étudié les résultats d'analyses bioinformatiques de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 afin de localiser une région promotrice putative et d'identifier les sites de liaison putatifs de différents facteurs de transcription. Ensuite, nous avons construit un plasmide rapporteur sous le contrôle d'une région promotrice putative de ces miRNAs. Nous avons aussi testé, par l'intermédiaire de siRNA et d'inhibiteurs chimiques, le rôle potentiel des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et CREB dans l'expression des miR-132 et miR-212. Les résultats de ces études sont en faveur d'un rôle du facteur CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS.

Enfin, nous avons étudié l'abondance protéique de deux cibles rapportées du miR-132, SirT1 et p300. Les données obtenues nous laissent spéculer que p300 pourrait intervenir dans une boucle de rétro-régulation de l'expression des miR-132 et miR-212.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur: P. Renard

Remerciements

Arrivée au terme de ces 10 mois de mémoire, je tiens à remercier de nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration.

Je souhaite tout d'abord remercier Thierry Arnould, ainsi que les autres Seniors de l'URBC de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens ensuite à remercier ma promotrice, Patsy Renard, pour sa disponibilité, son suivi, ses conseils et critiques qui m'ont aiguillée tout au long des recherches mais aussi au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Un immense merci également à Aurélie, ma tutrice, pour sa présence, son aide, ses réponses à mes nombreuses questions, l'apprentissage des techniques, sa bonne humeur au quotidien et les nombreux fous rires que nous avons partagés au cours de ces 10 mois de recherche.

Merci aux membres de l'équipe Dyso, pour leurs remarques constructives lors des réunions, aux techniciens de l'URBC, pour leurs conseils, et de façon plus générale à tous les membres de l'URBC pour leur accueil.

Je remercie également Xavier De Bolle, pour son aide dans la construction du plasmide rapporteur et Frédéric Minner, pour ses conseils concernant les analyses statistiques des données.

Je tiens aussi à remercier mes cinq « co-bureauteurs » pour cette année passée en leur compagnie et particulièrement nos deux « Gossip girls » attitrées – elles se reconnaîtront – pour tous les bons moments que j'ai passé avec elles, ainsi qu'en présence des autres copains de bio.

Enfin, je tiens également à remercier mon entourage pour son soutien et ses encouragements tout au long de mes études.

Liste des abréviations

5'TOP	5' terminal oligopyrimidine tract
AChE	Acétylcholine estérase
ADAR	Adenosine deaminases acting on RNA
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago	Argonaute
ALD	Alcoholic liver disease
AP-1	Activating protein 1
ARE	Adenine/uridine rich elements
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARS2	Arsenate-resistance protein 2
ATF	Activating transcription factor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BTG2	B-cell translocation gene 2
CBP	CREB binding protein
CFU-GM	Colony-forming unit for granulocytes-monocytes
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
CMV	Cytomégalovirus
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DED	Death effector domain
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Egr-1	Early growth response factor-1
eIF	Eukaryotic initiation factor
Elk-1	Ets-like transcription factor-1
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EST	Expressed sequenced tag
ETF	EGFR-specific transcription factor
Ets	E-twenty six
Etv1	Ets transcript variant 1
FGF	Fibroblast growth factor
FMRP	Fragile-X-mental-retardation protein
g	Gravité (9,81 m/sec ²)
GADD45 α	Growth Arrest and DNA Damage 45 α
GAP	GTPase-activating protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HCMV	Human cytomegalovirus

HDAC	Histone désacétylase
HEK 293	Human embryonic kidney 293 cells
HMGN1	High-mobility group nucleosome binding domain 1
HRP	Horseradish peroxidase
HSV-1	Herpes simplex virus-1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IKK	Kinases I κ B
IL	Interleukine
Inr-like	Initiator like
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRAK-1	IL-1 receptor-associated kinase 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
JARID1A	Jumonji, AT-rich interactive domain 1A
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LBP	LPS-binding protein
LEC	Cellules endothéliales lymphatiques
LH	Hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MeCP2	Methyl CpG-binding protein 2
mGluR	Récepteur au glutamate métabotrope
miRNAs	MicroRNAs
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MSK	Mitogen- and stress-activated protein kinase
NAD	Nicotinamide adénosine dinucléotide
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
PAIP2A	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PED/PEA-15	Phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
polyA	Poly-adénine
REST	RE1 silencing transcription factor
RFX4	Regulatory factor X4
RISC	RNA-induced silencing complex
ROCK-II	Rho-associated kinase II
RPM	Rotations par minute

RSK	Ribosomal s6 kinase
RT	Rétro-transcription
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
SACO	Serial Analysis of Chromatin Occupancy
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDN	Small RNA degrading nuclease
siCREB	siRNA spécifiques de CREB
siNT	siRNA non-target
siP65	siRNA spécifiques de p65
siRNA	Small interfering RNA
Sp1	Specificity protein 1
SPRED1	Sprouty-related, EVH1 domain containing 1
SRF	Serum response factor
STAT-1	Signal transducers and activators of transcription-1
SV40	Simian virus 40
TAB	TAK1-binding protein
TAK	TGF- β activated kinase
TBK1	TANK-binding kinase-1
TBS	Tris buffer saline
TF	Tissue factor
TGF- β	Transforming growth factor β
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TORC	Transducer of regulated CREB
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAIL	Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRBP	TAR RNA-binding protein
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tudor SN	Tudor staphylococcal nuclease homolog
TUT4	Terminal uridylyltransferase 4
UTR	Untranslated region
VSMC	Vascular smooth muscle cells
ZO-1	Zonula occludens 1

Table des matières

PREFACE	4
INTRODUCTION	7
I. La biogenèse, les mécanismes d'action et la régulation de l'expression des microRNAs.....	8
I.1. La biogenèse des miRNAs.....	8
I.2. Les fonctions des miRNAs	8
I.2.a. Les fonctions répressives des miRNAs : dégradation des ARNm cibles et répression traductionnelle.....	9
I.2.b. Les fonctions activatrices des miRNAs : activation de la traduction et de la transcription de gènes cibles	10
I.3. La régulation de l'expression des miRNAs	10
I.3.a. La régulation transcriptionnelle des miRNAs	10
I.3.b. La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs	14
II. L'implication des miRNAs dans l'inflammation et les contextes dans lesquels les miR-132 et miR-212 ont été décrits.....	15
II.1. Les miRNAs et l'inflammation se régulent mutuellement.....	15
II.2. Les miR-132 et miR-212 ont été décrits dans des contextes divers	16
II.2.a. Les miR-132 et -212 dans le contexte inflammatoire	16
II.2.b. Les miR-132 et -212 dans le contexte neuronal.....	18
II.2.c. Les miR-132 et miR-212 dans le cadre du cancer	21
II.2.d. Autres contextes dans lesquels les miR-132 et -212 ont été décrits ...	22
III. Les voies de signalisation induites par le LPS	23
III.1. Les PAMPs et TLR.....	24
III.2. L'activation des réponses cellulaires au LPS	24
III.2.a. L'activation du facteur de transcription NF-κB via les voies dépendantes et indépendantes de MyD88	24
III.2.b. L'activation des MAPK ERK1/2, JNK et p38	25
III.2.c. Les facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et CREB	26
OBJECTIFS.....	27
MATERIEL ET METHODES.....	29
I. Culture et traitement des cellules THP-1.....	30
I.1. Description de la lignée THP-1	30
I.2. Culture cellulaire.....	30
I.3. Stimulation cellulaire.....	30
I.3.a. Différenciation au PMA	30
I.3.b. Stimulation au LPS.....	30
I.3.c. Pré-incubation en présence de différents inhibiteurs.....	31
I.4. Transfection de siRNA dans les THP-1.....	31
I.4.a. Principe	31
I.4.b. Optimisations de transfection de siRNA.....	31
I.4.c. Transfection de sip65 et siCREB.....	32
II. Extractions protéiques et Western Blots	32
II.1. Extractions et dosages protéiques	32
II.2. Western Blots.....	33

II.2.a.	Principe	33
II.2.b.	Méthode	33
III.	Extractions protéiques nucléaires et tests de liaison à l'ADN de facteurs de transcription	35
III.1.	<i>Extractions protéiques nucléaires</i>	<i>35</i>
III.1.a.	Principe	35
III.1.b.	Méthode	35
III.2.	<i>Test de liaison à l'ADN (TransAM)</i>	<i>35</i>
III.2.a.	Principe	35
III.2.b.	Méthode	36
IV.	Analyse de l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que de leur forme primaire	36
IV.1.	<i>Extractions d'ARN.....</i>	<i>36</i>
IV.1.a.	Extractions avec le miRNeasy® MiniKit (Qiagen)	36
IV.1.b.	Extractions avec le TRI Reagent Solution (Ambion)	36
IV.1.c.	Extractions avec le RNeasy® MiniKit (Qiagen)	37
IV.2.	<i>Rétro-transcription et quantification de l'expression des miRNAs matures et du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel</i>	<i>37</i>
IV.2.a.	Principe	37
IV.2.b.	Etude des formes matures.....	37
IV.2.c.	Etude du pri-miR-132/212.....	38
V.	Construction d'un plasmide rapporteur encodant un promoteur putatif des miR-132 et miR-212 et transfection de ce plasmide dans les cellules THP-1	40
V.1.	<i>Principe</i>	<i>40</i>
V.2.	<i>Construction du plasmide rapporteur</i>	<i>40</i>
V.2.a.	Extraction de l'ADN génomique de cellules THP-1 et tentatives d'amplification du promoteur avec la Phusion polymérase	40
V.2.b.	Amplification et extraction des BAC (Bacterial Artificial Chromosome)	40
V.2.c.	Amplification par PCR de la région promotrice putative des miR-132 et -212	41
V.2.d.	Purification et restriction diagnostique de la région promotrice putative	41
V.2.e.	Clonage de la région promotrice putative des miR-132/212.....	41
V.2.f.	Transformation du pSKOriTKan+promoteur en bactéries DH10B	42
V.2.g.	Amplification des bactéries transformées par le pSKOriTKan+ promoteur, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide.....	42
V.2.h.	Clonage du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2	42
V.2.i.	Transformation du pGL4.10 Luc2 + promoteur en bactéries DH10B, amplification des bactéries transformées, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide.....	43
V.3.	<i>Transfection du plasmide rapporteur dans les THP-1.....</i>	<i>43</i>
V.3.a.	Optimisation de transfection plasmidique.....	43
V.3.b.	Nucléofection et stimulation des cellules.....	43
V.3.c.	Analyse des activités luciférase de Firefly et de Renilla	44
VI.	Analyses statistiques.....	44
	RESULTATS ET DISCUSSION	45
I.	Les miR-132 et miR-212 sont induits lors de la stimulation au LPS des cellules THP-1	46

II. Etude de l'expression du pri-miR-132/212	48
II.1. Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme.....	48
II.2. Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel...	49
III. Les miR-132 et miR-212 sont transcriptionnellement induits dans les cellules THP-1 stimulées au LPS	51
IV. Les rôles d'AP-1, NF-κB et CREB dans l'expression des miR-132 et miR-212	51
IV.1. Analyse bioinformatique de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212	52
IV.2. Inhibition du facteur de transcription AP-1.....	52
IV.3. Répression de CREB et p65.....	54
IV.3.a. Optimisations de transfection de siRNA.....	54
IV.3.b. Transfection de siRNA contre CREB et p65	55
IV.4. Inhibition du facteur de transcription CREB.....	56
V. Construction d'un plasmide rapporteur luciférase contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212	58
V.1. Analyse de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 et sélection d'une région promotrice putative	59
V.2. Construction du plasmide rapporteur	59
V.3. Transfection du plasmide rapporteur dans les cellules THP-1.....	61
V.3.a. Optimisation de la transfection plasmidique.....	61
V.3.b. Nucléofection du plasmide rapporteur contenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212	61
VI. Etude de l'expression de deux cibles du miR-132 : SirT1 et p300	64
VI.1. Etude de l'abondance de SirT1	64
VI.2. Etude de l'abondance de p300.....	65
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	67
BIBLIOGRAPHIE	76
ANNEXES	86
Annexe 1 : Analyse des sites putatifs de liaison de facteurs de transcription dans la séquence génomique humaine comprise entre les 5000 pb en amont du pre-miR-212 et l'extrémité aval pre-miR-132 (longueur totale : 5473 pb).	87
Annexe 2 : Résultats du séquençage de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 et alignement des séquences clonées à la séquence de référence « ref/NT_010718.16/ Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly »	92
Annexe 3 : Localisation des sites CREB importants pour la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines.....	97

Préface

Découverts en 1993 par Lee et ses collègues (Lee et al., 1993), les microRNAs (miRNAs) constituent une classe de petits ARN (acide ribonucléique) régulateurs d'environ 22 nucléotides capables de réguler l'expression des gènes essentiellement au niveau post-transcriptionnel en interagissant avec des ARN messagers (ARNm). Dans la plupart des cas, l'interaction entre les miRNAs et leurs ARNm cibles consiste en un appariement plus ou moins parfait entre la région 3'UTR (untranslated region) des ARNm et une région « seed » située entre les nucléotides 2 à 8 dans la région 5' des miRNAs. Selon le degré de complémentarité de cette interaction, les miRNAs induisent soit le clivage et la dégradation des ARNm (lorsque la complémentarité est parfaite ou presque parfaite), soit l'inhibition de leur traduction (lorsque l'appariement entre les miRNAs et leurs cibles est imparfait) (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Actuellement, environ 800 gènes encodant des miRNAs ont été identifiés dans le génome humain (Krol et al., 2010) et représenteraient 1 à 4% des gènes exprimés ; ils dépassent ainsi largement en nombre les autres grandes classes de régulateurs telles que les kinases (Ding et al., 2009). En outre, les prédictions bioinformatiques basées sur la reconnaissance entre la région « seed » des miRNAs et les 3'UTR des ARNm avancent que chaque miRNA pourrait avoir des douzaines voire des centaines de cibles (Ding et al., 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Un à deux tiers des gènes humains seraient ainsi sous le contrôle de miRNAs (Fabian et al., 2010), ce qui explique qu'ils soient impliqués dans de nombreux processus biologiques, tels que la différenciation cellulaire, le développement, la prolifération, l'apoptose, le contrôle du métabolisme ou encore l'inflammation (Kim et al., 2009, O'Connell et al., 2010), et que leur dérégulation soit associée à de nombreuses maladies (Ding et al., 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009).

Afin de percevoir comment ces petits ARN régulateurs interviennent dans la physiologie cellulaire, il est nécessaire d'en identifier les cibles mais aussi de mieux comprendre comment leur propre expression est régulée. D'après les données de la littérature, il émerge que la régulation de l'expression des miRNAs s'effectue à trois niveaux principalement: au niveau de leur transcription, au niveau de leur biogenèse ainsi qu'au niveau de leur localisation subcellulaire (O'Connell et al., 2010). Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de deux miRNAs induits lors de la stimulation au lipopolysaccharide (LPS) de la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1, les miR-132 et miR-212 (Taganov et al., 2006, Pauley et al., 2010, Nahid et al., 2009). Afin d'aborder cette question, nous avons tout d'abord étudié la cinétique d'induction de ces deux miRNAs ainsi que celle de leur forme primaire. Nous avons ensuite combiné les prédictions bioinformatiques de différentes études (détaillées ultérieurement) afin de déterminer une région promotrice putative pour ces deux miRNAs et avons construit un plasmide rapporteur comportant cette région. Nous avons également testé le potentiel régulateur de plusieurs facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212 au sein des cellules THP-1. Enfin, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression protéique de deux cibles décrites du miR-132, qui pourraient elles-mêmes participer à des boucles de régulation de la transcription des miR-132 et miR-212, en modulant l'activité de facteurs de transcription jouant des rôles majeurs dans les réponses inflammatoires.

Afin de mieux comprendre le contexte dans lequel cette étude a été réalisée, nous reverrons tout d'abord les processus impliqués dans la biogenèse et la régulation de l'expression des miRNAs. Ensuite, nous décrirons brièvement les différents contextes dans lesquels les miR-132 et miR-212 ont été décrits et les rôles physiologiques qu'on leur connaît actuellement. Enfin, nous passerons également en revue les voies par lesquelles l'inflammation (et plus particulièrement l'exposition de cellules au LPS) induit l'activation de divers régulateurs

transcriptionnels, dont certains pourraient jouer un rôle dans l'expression des miR-132 et miR-212.

Introduction

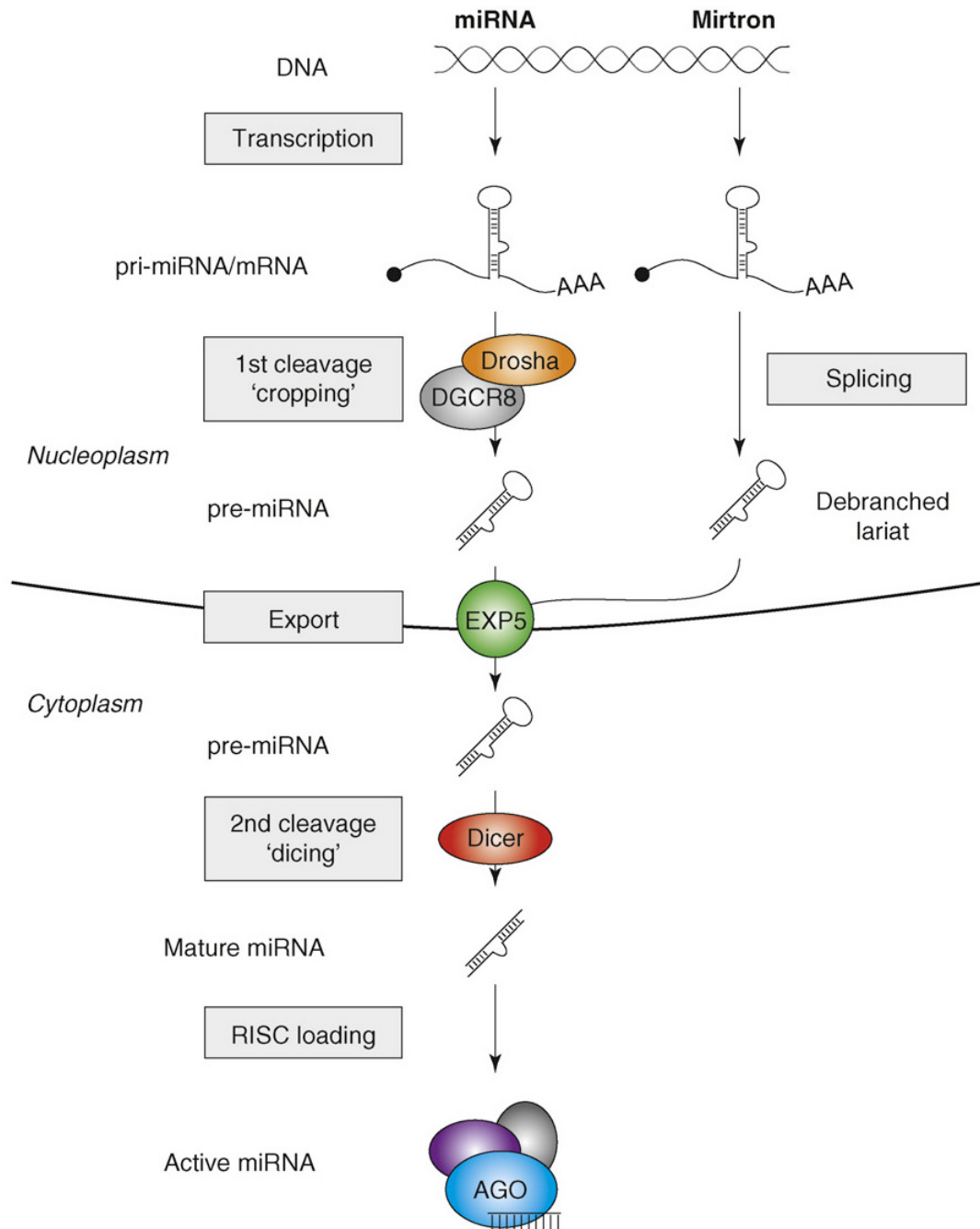


Figure 1.1 : Biogenèse des miRNAs. Les gènes encodant les miRNAs sont tout d'abord transcrits en formes primaires, appelées pri-miRNAs, qui subissent dans le noyau une première étape de maturation par la protéine Drosha et son partenaire DGCR8 menant à la libération de pre-miRNAs. Les mirtrons génèrent directement des pre-miRNAs par épissage et échappent donc à cette étape de maturation. Les pre-miRNAs sont ensuite exportés dans le cytoplasme où un second clivage, réalisé par l'enzyme Dicer, permet la libération de duplexes de miRNAs. Les brins guides sont ensuite séparés des brins passagers et chargés sur des complexes RISC pour former des complexes miRISC actifs, lesquels peuvent se diriger vers des ARNm cibles afin de réprimer leur traduction ou induire leur dégradation (Ding, Weiler et al. 2009).

I. La biogenèse, les mécanismes d'action et la régulation de l'expression des microRNAs

I.1. La biogenèse des miRNAs

La biogenèse des miRNAs est un processus relativement complexe faisant intervenir différentes étapes de maturation (figure 1.1). La plupart des gènes encodant les miRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Lee et al., 2004) (la même enzyme que celle qui transcrit les gènes encodant des protéines) en une forme primaire, appelée « pri-miRNA », longue de plusieurs centaines ou milliers de nucléotides, portant une coiffe en son extrémité 5', une queue de poly-A (poly-adénine) au niveau de son extrémité 3' ainsi qu'une ou plusieurs structures secondaires en épingle à cheveux, ou « hairpin ». Ces structures sont reconnues et clivées au niveau de leur base dans le noyau par le complexe « Microprocesseur », composé d'une ribonucléase de type III, Drosha, ainsi que de protéines associées dont DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Ceci engendre la libération de précurseurs en hairpin nommés pre-miRNAs (Kim et al., 2009). Il est à noter que les mirtrons, une classe non canonique de miRNAs générés à partir de structures en hairpin introniques, sont directement convertis en pre-miRNAs suite à un événement d'épissage et qu'ils échappent donc à l'étape de maturation dépendante de Drosha (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Les pre-miRNAs sont ensuite reconnus et exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5 et son cofacteur Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, les pre-miRNAs sont clivés à proximité de la boucle de la structure en hairpin par Dicer, une autre ribonucléase de type III opérant avec son partenaire protéique TRBP (TAR RNA-binding protein) et engendrant par ce processus la libération de duplexes de miRNAs d'environ 22 nucléotides (Kim et al., 2009). Ces duplexes sont composés d'un brin dit « guide » (miRNA) ainsi que d'un brin « passager » (miRNA*). Dans la plupart des cas, le brin guide est thermodynamiquement moins stable au niveau de son extrémité 5' et est, suite à l'action d'une hélicase, préférentiellement chargé sur le complexe effecteur RISC (RNA-induced silencing complex) pour former le complexe miRISC, tandis que le brin passager est dégradé. Néanmoins, certains exemples montrent qu'à la fois les miRNAs et miRNAs* peuvent être retenus dans les complexes RISC et cibler différentes populations d'ARNm (Breving and Esquela-Kerscher, 2009).

I.2. Les fonctions des miRNAs

En général, les miRNAs dirigent le complexe RISC vers leurs ARNm cibles suite à la complémentarité de séquence existant le plus souvent entre la région « seed » du miRNA et la 3'UTR de l'ARNm et induisent le clivage ou la répression de la traduction de l'ARNm selon le degré de complémentarité de l'appariement. Cette vision du mode d'action des miRNAs semble actuellement quelque peu simpliste car (i) des régions autres que la région « seed » des miRNAs interviennent aussi dans la reconnaissance des ARNm cibles ; (ii) les miRNAs reconnaissent des régions autres que la 3'UTR des ARNm (notamment des régions situées dans la 5'UTR ou dans la séquence codante) ; (iii) un appariement imparfait entre des miRNAs et leurs cibles conduit parfois à leur dégradation (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Par ailleurs, il a également été démontré que les miRNAs pouvaient moduler positivement l'expression des gènes au niveau de la traduction protéique ainsi qu'induire

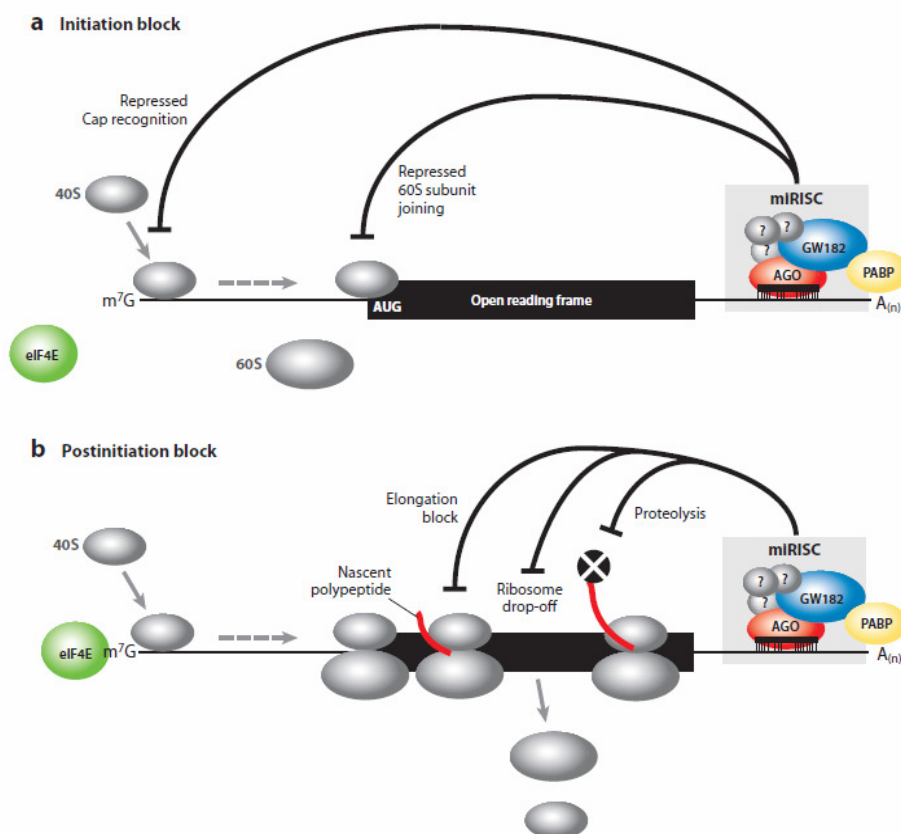


Figure 1.2 : Répression de la traduction des ARNm par les miRNAs lors de l'initiation de la traduction (a) ou à un moment ultérieur (b). (a) Répression de la traduction des ARNm lors de l'initiation. Le complexe miRISC peut entrer en compétition avec le facteur eIF4F pour la liaison de la coiffe et empêcher de cette façon le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome, ou empêcher la liaison de la sous-unité 60S du ribosome et ainsi empêcher la formation du complexe ribosomal 80S. (b) Répression de la traduction des ARNm après l'initiation. Le complexe miRISC pourrait inhiber l'élongation du transcrit par les ribosomes, induire un décrochement des ribosomes ou favoriser la dégradation des transcrits naissants. Aucun mécanisme n'a cependant encore été mis en évidence pour supporter ces modèles (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

l'expression de gènes en ciblant leur promoteur (Vasudevan et al., 2007, Verdel et al., 2009, Place et al., 2008, Huang et al., 2010).

1.2.a. Les fonctions répressives des miRNAs : dégradation des ARNm cibles et répression traductionnelle

Le composant clé du complexe RISC est la protéine Argonaute, dont il existe quatre membres (Ago1-4/eIF2C) chez les mammifères. Ago2 est le seul membre doué d'une activité de « slicing », c'est-à-dire de clivage endonucléolytique de l'ARNm cible au milieu de la région de complémentarité entre cet ARNm et le miRNA (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Toutes les protéines Ago présentent par contre la capacité de réprimer la traduction de l'ARNm en protéine ainsi que d'altérer la stabilité de l'ARNm cible par l'intermédiaire de mécanismes autres que le slicing (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Il est possible que l'abondance relative des différents membres de la famille Ago dans les cellules influence l'efficacité de la répression exercée par les miRNAs dans différents tissus ou types cellulaires (Krol et al., 2010). Outre ces protéines, le complexe miRISC est composé d'autres membres tels que le marqueur de corps P (« P bodies ») GW182, essentiel à la fonction répressive des miRNAs (Krol et al., 2010), des protéines liant l'ARN telles que la protéine FMRP (fragile-X-mental-retardation protein), ainsi que de protéines appartenant à la famille des hélicases DExD/H comme l'activateur de décoiffage RCK/p54. Il est probable que ce soit la combinaison de ces protéines dans le complexe miRISC qui influence le type de régulation de l'expression des cibles des miRNAs (dégradation de l'ARNm ou répression de la traduction) ainsi que son efficacité (Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Krol et al., 2010).

Les miRNAs qui répriment la traduction protéique de leurs ARNm cibles exercent leur contrôle soit lors de l'initiation de la traduction, soit à une étape ultérieure (figure 1.2). Ici encore, ce sont probablement les diverses protéines entrant dans la composition du complexe miRISC qui déterminent ce choix. Il a été démontré que Ago2 pouvait bloquer l'initiation de la traduction en entrant en compétition avec eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) pour lier la coiffe de l'ARNm ou en interagissant avec eIF6, empêchant ainsi l'assemblage des sous-unités 40S et 60S du ribosome. Les miRNAs peuvent également perturber l'initiation de la traduction des ARNm auxquels ils sont associés en bloquant la liaison de la poly-A binding protein (Zhao and Liu, 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Ding et al., 2009). D'autres études ont montré que dans certains cas, l'initiation de la traduction se déroulait normalement mais que par un mécanisme encore inconnu, l'élongation était stoppée et le transcrit naissant, dégradé. Selon certaines hypothèses, il se pourrait que la présence des miRNAs sur les ARNm provoque un décrochage accru des ribosomes, conduisant à une terminaison précoce de la traduction et à la formation de protéines immatures rapidement dégradées (Zhao and Liu, 2009, Fabian et al., 2010).

Différents mécanismes sont également impliqués lorsque les miRNAs entraînent une dégradation de leurs ARNm cibles. L'ARNm peut être slicé, clivé en dehors de sa région de complémentarité avec le miRNA, déadénylé ou encore décoiffé et ensuite dégradé. Enfin, les ARNm associés aux complexes miRISC peuvent être relocalisés au niveau de structures cytoplasmiques appelées corps P, enrichies en facteurs de dégradation et de répression traductionnelle des ARNm (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). La formation des corps P et la répression exercée par les miRNAs seraient d'ailleurs liées : il a été remarqué que la répression de la formation des corps P inhibait la répression exercée par les miRNAs au niveau de la traduction et que la répression des fonctions exercées par le complexe RISC

inhibait non seulement le silençage dépendant des miRNAs mais aussi la formation des corps P (Zhao and Liu, 2009).

I.2.b. Les fonctions activatrices des miRNAs : activation de la traduction et de la transcription de gènes cibles

Outre les fonctions classiques de répression traductionnelle et de dégradation des ARNm, de nouvelles fonctions non canoniques des miRNAs ont été découvertes. Par exemple, il a été démontré que des miRNAs pouvaient réprimer ou activer la traduction protéique en fonction de la présence ou non de sérum dans le milieu de culture au cours du cycle cellulaire (Vasudevan et al., 2007). Cette capacité des miRNAs à activer la traduction dépend de la présence d'éléments ARE (adenine/uridine rich elements) dans les séquences de leurs ARNm cibles. Les éléments ARE sont situés dans la région 3'UTR de certains ARNm dont ils réduisent fortement la stabilité. Cependant, lorsque les miRNAs et les protéines Ago et FXRP qui composent le complexe miRISC sont recrutés au niveau de ces éléments, la traduction des ARNm cibles est augmentée. D'autres miRNAs activent la traduction de leurs cibles en agissant par des mécanismes différents. Les miR-10a et miR-122 par exemple, se lient aux motifs 5'TOP (5' terminal oligopyrimidine tract) situés dans les 5'UTR de certains ARNm et favorisent leur traduction (Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Zhao and Liu, 2009, Krol et al., 2010).

Par ailleurs, il a également été démontré que le miR-373 était capable d'induire la transcription de gènes cibles en se liant à des séquences complémentaires situées dans le promoteur de ces gènes. Si le mécanisme exact d'activation de la transcription reste encore obscur à l'heure actuelle, on sait qu'il nécessite une complémentarité entre le miRNA et la région promotrice ciblée et qu'il fait intervenir des remaniements de la chromatine (Place et al., 2008). Bien qu'à l'heure actuelle et à notre connaissance, le miR-373 soit le seul pour lequel il ait été démontré une telle aptitude, de futures recherches devraient permettre de déterminer si cette fonction est partagée par d'autres miRNAs.

I.3. La régulation de l'expression des miRNAs

Comme nous l'avons mentionné précédemment, on considère actuellement que l'expression des miRNAs est régulée à trois niveaux principalement : au niveau de leur transcription, au niveau de leur maturation ainsi qu'au niveau de leur localisation subcellulaire (O'Connell et al., 2010) ; chacun de ces niveaux pouvant être lui-même affecté par différentes formes de stress cellulaires, dont l'inflammation.

I.3.a. La régulation transcriptionnelle des miRNAs

Bien que la régulation transcriptionnelle soit considérée comme la principale étape de contrôle de l'expression des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008), elle est nettement moins connue que leur biogenèse. Les gènes encodant les miRNAs présentent différents types d'organisation génomique, illustrés à la figure 1.3. On distingue les miRNAs intergéniques (qui représentent environ 50% des miRNAs), situés en dehors des unités de transcription connues, des miRNAs géniques, introniques ou exoniques, situés au sein de gènes annotés, codants ou non codants (Kim et al., 2009). Les miRNAs intergéniques disposent de leur

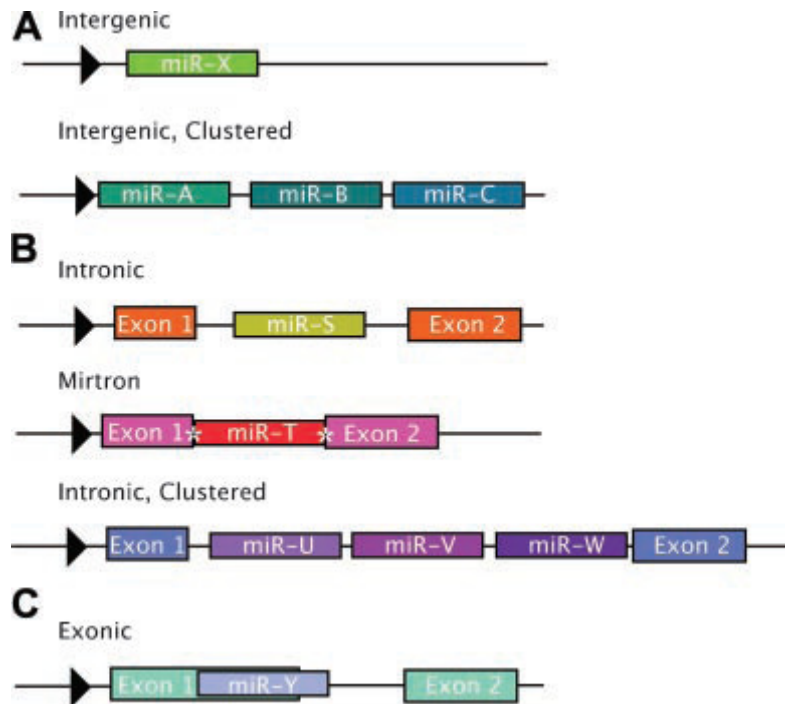


Figure 1.3 : Localisation et organisation génomique des miRNAs. A. Les miRNAs intergéniques sont situés en dehors des unités de transcription connues ; ils disposent de leur propre promoteur (illustré par une flèche noire) et peuvent se présenter sous forme monocistronique (au-dessus) ou polycistronique (en dessous). B. Les miRNAs introniques sont situés au sein des introns de gènes annotés et sont la plupart du temps transcrits à partir du même promoteur que leur gène hôte. Ils peuvent également se présenter sous forme monocistronique (au-dessus) ou polycistronique (en dessous). Les mirtrons constituent une forme particulière de miRNAs introniques dont la séquence du pre-miRNA coïncide exactement avec celle de l'intron (les sites d'épissage sont représentés par des étoiles blanches). C. Les miRNAs exoniques, plus rares, chevauchent la plupart du temps un exon et un intron d'un gène non codant. Ils sont également le plus souvent sous le contrôle du promoteur de leur gène hôte (Olena and Patton 2010).

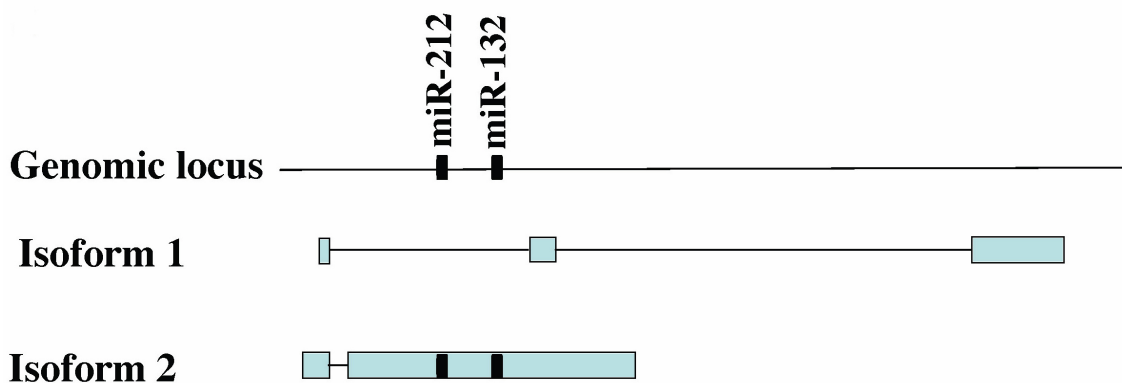


Figure 1.4 : Identification de variants d'épissage alternatif du locus encodant les miR-132 et miR-212 murins. Les rectangles noirs illustrent les séquences des pre-miR-132 et pre-miR-212, les boîtes bleues représentent les exons et les lignes entre les boîtes bleues, les introns (Ucar, Vafaizadeh et al. 2010).

propre promoteur, tandis que les miRNAs géniques sont la plupart du temps transcrits sous le contrôle du promoteur de leur gène hôte (Olena and Patton, 2010), bien qu'il ait été suggéré récemment qu'une fraction considérable (25 à 35% environ) des miRNAs géniques disposeraient de leur propre promoteur (Corcoran et al., 2009, Wang et al., 2009, Ozsolak et al., 2008, Monteys et al., 2010). Selon Ozsolak, les miRNAs introniques situés assez loin du promoteur de leur gène hôte (plusieurs dizaines de kilobases (kb)) auraient rapidement évolué de façon à acquérir leur propre promoteur, afin de rendre la transcription plus rapide et efficace. En outre, il a été observé que les miRNAs introniques les mieux conservés au cours de l'évolution étaient ceux qui disposaient de leur propre promoteur. Ceci suggère que suite à leur apparition, les miRNAs introniques utiliseraient d'abord le promoteur de leur gène hôte et acquerraient par la suite un promoteur indépendant (Ozsolak et al., 2008). En ce qui concerne les miR-132 et -212 étudiés au cours de ce mémoire, ils sont situés en région intergénique chez l'homme; néanmoins, il est intéressant de noter que ces mêmes deux miRNAs sont situés au sein de l'intron 1 d'un gène non codant chez le rat (Vo et al., 2005) et la souris (Remenyi et al., 2010) ou, comme ce fut identifié plus récemment, au sein de l'exon 2 d'un variant d'épissage alternatif de ce gène (figure 1.4) (Ucar et al., 2010). Par ailleurs, il a été démontré que les miRNAs distants de moins de 5 kb avaient généralement des profils d'expression corrélés, ce qui suggère qu'ils seraient produits à partir d'un même transcrit polycistronique (Baskerville and Bartel, 2005). Environ 50% des miRNAs seraient ainsi disposés en clusters (Kim et al., 2009), configuration dans laquelle se situent les miR-132 et -212 chez la souris (Fiedler et al., 2008) mais aussi chez l'homme, comme cela a été démontré au cours de ce mémoire.

Plusieurs approches ont été proposées jusqu'à présent pour localiser et caractériser les promoteurs des gènes encodant les miRNAs. Certains auteurs (Barroso-delJesus et al., 2008, Fujita et al., 2008) ont par exemple réalisé des études de génomique comparative et ont analysé la conservation entre les espèces afin de déterminer les régions promotrices de miRNAs, avant de vérifier leurs prédictions de façon expérimentale. Néanmoins, ces études sont restreintes à quelques miRNAs et ne permettent pas une caractérisation détaillée et à large échelle des régions promotrices des miRNAs.

Pour aborder ce problème, Zhou et son équipe (Zhou et al., 2007) ont développé un algorithme appelé « CoVote » destiné à identifier les promoteurs putatifs de miRNAs intergéniques au sein de 4 espèces, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa*. Le promoteur putatif du miR-212 humain identifié par cet algorithme est illustré à la figure 1.5. L'algorithme CoVote est basé sur le fait que des gènes transcrits par l'ARN polymérase II devraient présenter des caractéristiques communes, notamment des motifs de liaison pour des facteurs de transcription impliqués dans le recrutement de la machinerie basale de transcription. En analysant les régions situées en amont des pre-miRNAs et pri-miRNAs, ces chercheurs ont mis en évidence que la plupart des promoteurs principaux (« core promoter ») des gènes encodant des miRNAs étaient situés assez près de la structure en hairpin du pre-miRNA et près de la première hairpin du pre-miRNA dans le cas des miRNAs en clusters transcrits de façon polycistronique. En outre, l'analyse des motifs situés au sein des promoteurs principaux indique que ceux-ci comportent de nombreux éléments en *cis* essentiels à l'initiation de la transcription. Les auteurs ont également révélé que des éléments Inr-like (initiator like), assez communs dans les promoteurs de gènes encodant des protéines, étaient également présents dans les promoteurs des gènes encodant des miRNAs. Par contre, les chercheurs ont déduit de leurs observations que chez l'homme, de même que chez *C. elegans*, les boîtes TATA ne semblaient pas nécessaires à la transcription de la plupart des miRNAs.

Afin d'étudier la structure des transcrits primaires de miRNAs intergéniques et d'en délimiter les extrémités, Saini et ses collègues (Saini et al., 2007) ont étudié à large échelle les sites d'initiation de la transcription, les signaux de polyadénylation, les îlots CpG, les données d'EST (expressed sequenced tag), les sites de liaison pour des facteurs de transcription ainsi que les signaux déterminant les extrémités 5' et 3' des transcrits. Ces données leur ont permis de mettre en évidence que les sites d'initiation de la transcription colocalisent avec les îlots CpG endéans les 4 kb en amont des séquences des miRNAs, ce qui suggère que le promoteur des miRNAs intergéniques se situerait dans la plupart des cas endéans les 4 kb en amont du pre-miRNA. L'analyse des sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription, qui permet de prédire la localisation du promoteur principal des gènes encodant des miRNAs, suggère également que celui-ci serait localisé à proximité du pre-miRNA, ce qui conforte les résultats obtenus par Zhou *et al.* Enfin, les auteurs ont également mis en évidence que la plupart des pri-miRNAs intergéniques auraient une longueur comprise entre 3 et 4 kb ainsi que des extrémités définies par le site d'initiation de la transcription d'une part et la présence d'un signal de queue poly(A) d'autre part.

Corcoran et ses collègues (Corcoran et al., 2009) ont quant à eux réalisé des immunoprécipitations de chromatine de l'ARN polymérase II suivies d'une analyse sur damier comportant des sondes de capture pour les régions bordant les gènes de miRNAs connus afin d'identifier les régions promotrices de ces miRNAs. Ils ont ensuite développé un programme nommé CPPP (*Core Promoter Prediction Program*) afin d'identifier les sites d'initiation de la transcription des miRNAs. Contrairement à ce qu'avaient suggéré Zhou et ses collègues, cette étude a démontré que les miRNAs intergéniques et quelques miRNAs géniques pouvaient être transcrits par l'ARN polymérase II au delà de 40 kb en amont du pre-miRNA, ce qui suggère que les pri-miRNAs pourraient être beaucoup plus longs que ce qui avait été initialement proposé. En revanche, ces chercheurs ont également observé que les promoteurs des miRNAs présentaient des caractéristiques semblables à celles que démontrent les promoteurs de gènes encodant des protéines, en ce qui concerne le contenu en GC et les profils de liaison des facteurs de transcription à l'ADN (acide désoxyribonucléique). Ceci conforte les résultats rapportés par Zhou. Une autre équipe s'est également basée sur des immunoprécipitations de chromatine pour déterminer les régions promotrices putatives de miRNAs. Ces chercheurs ont utilisé les données de ChIP-seq (immunoprécipitation de chromatine suivie du séquençage des régions immunoprécipitées) de l'ARN polymérase II et du facteur de transcription STAT-1 (signal transducers and activators of transcription-1) dans des cellules HeLa stimulées ou non à l'interféron gamma pour déterminer les régions promotrices putatives de 83 miRNAs présentant un promoteur actif dans ces conditions. Parmi ces 83 miRNAs sont inclus les miR-132 et miR-212 (la figure 1.5 illustre la région promotrice putative ainsi que les sites putatifs d'initiation de la transcription des miR-132 et miR-212). Ces chercheurs ont en outre déterminé que 60% des promoteurs identifiés avaient une longueur comprise entre 1 et 2 kb et que 34% des sites d'initiation de la transcription étaient situés endéans les 2 kb en amont du pre-miRNA considéré (figure 1.6) (Wang et al., 2010).

L'équipe de Marson (Marson et al., 2008) s'est quant à elle basée sur la présence d'une modification spécifique au niveau de l'histone H3 pour déterminer les régions d'initiation de la transcription. En effet, il a été démontré que l'histone H3 était triméthylée sur son résidu lysine 4 au niveau du site d'initiation de la transcription de la plupart des gènes, même lorsque ceux-ci sont peu transcrits. De plus, cette modification est spécifique aux sites d'initiation de la transcription (Barski et al., 2007). Marson et ses collègues ont donc utilisé cette

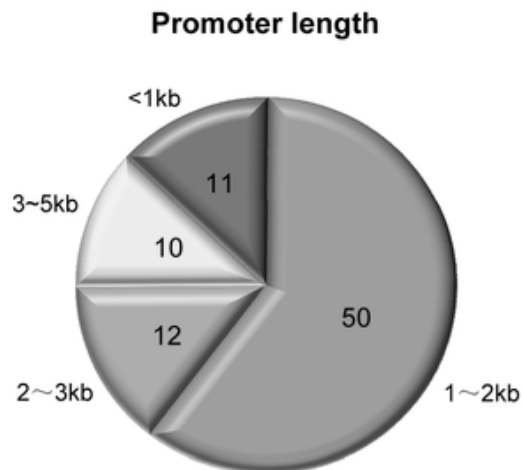
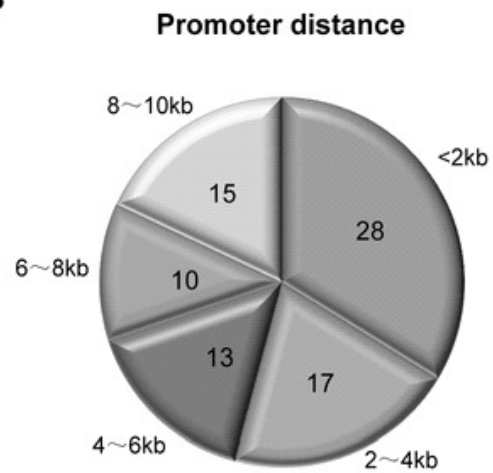
A**B**

Figure 1.6 : Statistiques concernant les prédictions de promoteurs de miRNAs. Les diagrammes montrent le nombre de miRNAs (sur les 83 identifiés lors de l'étude) présentant les différentes gammes de longueur de promoteur (A) ainsi que les gammes de distance des sites d'initiation de la transcription par rapport aux pre-miRNAs annotés (B) (Wang, Wang et al. 2010).

caractéristique afin de déterminer des sites putatifs d'initiation de la transcription de gènes encodant des miRNAs candidats (la région promotrice putative des miR-132 et -212 identifiée par cette équipe est également illustrée à la figure 1.5). Ils ont ensuite conforté leurs prédictions en les conjuguant aux données d'annotation des miRNAs (un score élevé était attribué si le site putatif d'initiation de la transcription se trouvait endéans les 5 kb en amont du miRNA), aux sets d'EST disponibles, ainsi qu'en comparant la conservation entre l'homme et la souris. Grâce aux données des sets d'EST, les chercheurs ont démontré que les transcrits prédits trouvaient effectivement leur origine au niveau des sites d'initiation de la transcription identifiés par leur méthode et continuaient le long des loci annotés des miRNAs matures (Marson et al., 2008). De plus, les régions identifiées comme étant des sites d'initiation de la transcription contiennent des îlots CpG, or ceux-ci sont souvent associés aux promoteurs. En utilisant une approche tout à fait similaire, basée sur les modifications des histones et la présence de motifs particuliers sur l'ADN, Wang et ses collègues (Wang et al., 2009) ont développé un logiciel nommé CoreBoost_HM permettant d'identifier les promoteurs principaux de gènes transcrits par l'ARN polymérase II et applicable aux miRNAs. La figure 1.5 illustre le site d'initiation de la transcription des miR-132 et -212 identifié par ce logiciel.

Ozsolak et ses collègues (Ozsolak et al., 2008) ont également développé une stratégie basée sur les modifications liées à la chromatine afin d'identifier les régions promotrices et les sites d'initiation de la transcription des miRNAs. En effet, ces chercheurs ont basé leurs études sur des modifications spécifiques des histones, la méthylation du résidu lysine 4 de l'histone 3 déjà mentionnée, ainsi que l'acétylation des lysines 9 et 14 de cette même protéine, afin d'identifier les régions promotrices transcriptionnellement actives. En outre, ces chercheurs ont exploité l'observation – réalisée entre autres par cette même équipe – selon laquelle la chromatine située au niveau des gènes transcrits et des sites de liaison des facteurs de transcription est déplétée en nucléosomes autour des sites d'initiation de la transcription. Cette démarche leur a permis d'identifier les promoteurs de 175 miRNAs humains et de mettre en évidence qu'il existe une région d'environ 70 pb (paires de bases) déplétée en nucléosomes au niveau du promoteur principal et du site d'initiation de la transcription. Etant donné que les facteurs de transcription se lient préférentiellement au niveau de ces zones dépourvues en nucléosomes, les auteurs ont suggéré la présence, dans ces régions, de sites de liaison pour les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des miRNAs. D'autre part, les chercheurs ont aussi observé que les régions correspondant aux formes matures des miRNAs étaient, contrairement aux régions promotrices, particulièrement enrichies en nucléosomes. Selon les auteurs, cette caractéristique pourrait résulter de marques épigénétiques encore non connues et jouer un rôle dans la maturation des miRNAs, en promouvant le recrutement des protéines impliquées dans leur biogenèse.

Si ces différentes études ont permis d'établir les caractéristiques générales et d'identifier des régions promotrices putatives pour de nombreux miRNAs, il en ressort que la régulation transcriptionnelle des miRNAs s'avère aussi complexe que celle des gènes encodant des protéines. En effet, il semble que les promoteurs des miRNAs soient sujets à des contrôles tant positifs que négatifs exercés par des facteurs de transcription, des enhancers, des éléments de silençage ainsi que des modifications épigénétiques (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Ainsi, afin de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle de miRNAs particuliers, des études au cas par cas impliquant des validations expérimentales semblent nécessaires. Au cours de ce mémoire, nous avons donc construit un plasmide rapporteur contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 humains, déterminée sur base des prédictions réalisées dans les études décrites ci-dessus. Cette approche a été développée dans l'optique de

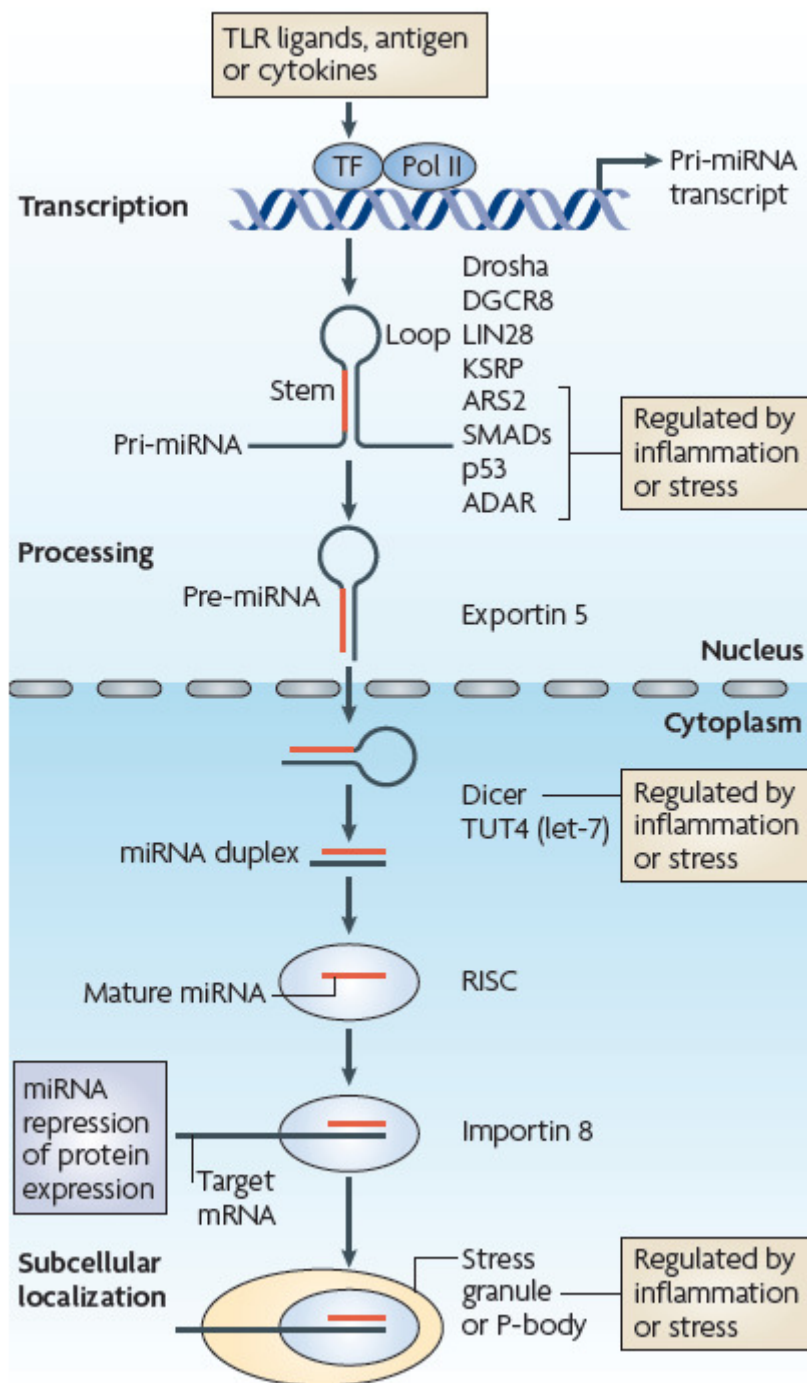


Figure 1.7 : La régulation de l'expression des miRNAs par les stress. L'expression des miRNAs est régulée à trois niveaux essentiellement (au niveau de la transcription, de la maturation et de la localisation subcellulaire), chacun d'entre eux pouvant être affecté par l'inflammation ou différentes formes de stress cellulaire. Tout d'abord, la transcription des miRNAs peut être contrôlée par des facteurs de transcription induits lors des réponses immunes (suite à une stimulation des TLR (Toll-like receptors), à la détection de cytokines pro-inflammatoires ou d'antigènes). Ensuite, la maturation des pri-miRNAs en pre-miRNAs peut être modulée par la présence de toute une série de facteurs dont certains sont affectés par l'inflammation. La conversion des pre-miRNAs en miRNAs matures peut également être influencée par l'inflammation ou les stress cellulaires. Enfin, l'inflammation et les stress peuvent modifier la localisation subcellulaire des miRNAs matures, en dirigeant ceux-ci vers les granules de stress ou les corps P (O'Connell, Rao et al. 2010).

valider expérimentalement la localisation du promoteur principal de ces miRNAs ainsi que le rôle de certains facteurs de transcription dans le contrôle de l'expression des miR-132 et -212.

I.3.b. La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs

Bien que le contrôle transcriptionnel soit une étape clé de la régulation de l'expression des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008), on n'observe pas toujours une corrélation exacte entre l'expression des pri-miRNAs et leur forme mature (Thomson et al., 2006) ; ceci suggère l'existence d'autres niveaux de contrôle assurant le maintien de taux optimaux de miRNAs dans les cellules.

Régulation de la voie de biogenèse des miRNAs

Au niveau de la biogenèse des miRNAs, l'étape de maturation dépendante de Drosha est sujette à différentes formes de régulation (figure 1.7). Par exemple, il a été démontré que l'activation des protéines SMAD en aval de la voie BMP (bone morphogenetic protein)/TGF- β (transforming growth factor β) stimulait la maturation du miR-21 par Drosha, selon un mécanisme encore peu compris (Kim et al., 2009). La protéine p53 favorise également la conversion des pri-miRNAs en pre-miRNAs en formant un complexe avec Drosha (O'Connell et al., 2010). Le clivage par Drosha du pri-miR-18 dépend quant à lui de la particule hétérogène ribonucléoprotéique A1. La protéine ARS2 (arsenate-resistance protein 2), exprimée dans les cellules hématopoïétiques en prolifération, appartient à un complexe liant les coiffes des ARN et favorise la maturation des pri-miRNAs. De nombreuses autres protéines liant l'ARN pourraient ainsi participer à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs (O'Connell et al., 2010).

Outre Drosha, d'autres protéines impliquées dans la biogenèse des miRNAs (comme Dicer) sont régulées par différents acteurs induisant des modifications de l'efficacité de la maturation des miRNAs. La protéine LIN28 par exemple, qui lie l'ARN, participerait à la suppression de la biogenèse du miRNA let-7 en bloquant ou interférant avec l'étape de maturation dépendante de Dicer. En effet, LIN28 recruterait la protéine TUT4 (terminal uridylyltransferase 4) qui, en uridyplant la forme précurseur de let-7, empêcherait la suite de sa maturation (figure 1.7). D'autre part, la réponse immune semble affecter l'abondance de différents acteurs de la voie de biogenèse des miRNAs. Par exemple, certaines cytokines telles que les interférons inhibent l'expression de Dicer et perturbent de cette façon la transformation des pre-miRNAs en miRNAs. Il semble également que la translocation des pre-miRNAs du noyau au cytoplasme puisse constituer un point de régulation de l'expression des miRNAs, bien que les mécanismes ne soient pas encore compris à l'heure actuelle (O'Connell et al., 2010, Yi et al., 2005).

Par ailleurs, il a été suggéré que des motifs en cis situés dans le promoteur des miRNAs pourraient influencer leur biogenèse. Le motif « A » (mA), par exemple, que l'on retrouve en amont d'à peu près tous les miRNAs intergéniques de *C. elegans* mais pas dans les promoteurs des gènes codant pour des protéines, ne semble pas intervenir dans la régulation transcriptionnelle des miRNAs mais pourrait réguler leur biogenèse au niveau post-transcriptionnel, selon un mécanisme encore obscur (Turner and Slack, 2009).

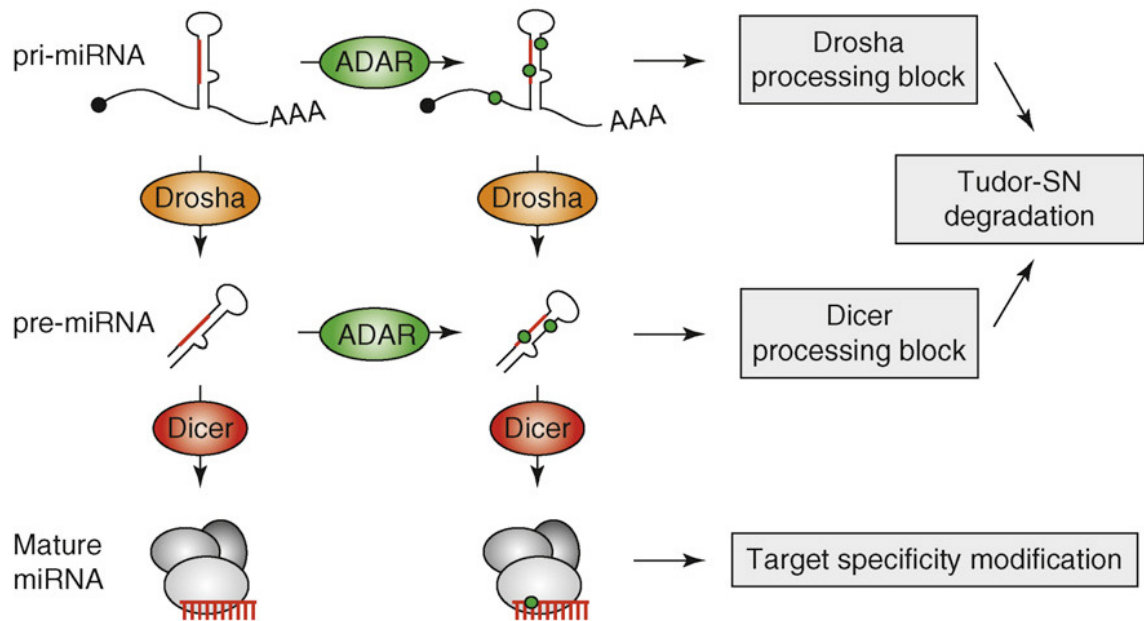


Figure 1.8 : Régulation de la maturation et de l'activité des miRNAs par les protéines ADAR. L'édition (indiquée par les points verts) des pri-miRNAs ou pre-miRNAs peut empêcher une maturation efficace par Drosha ou Dicer et entraîner la dégradation des molécules éditées par Tudor SN (Tudor staphylococcal nuclease homolog), tandis que l'édition au niveau de la séquence des miRNAs matures peut affecter la spécificité de reconnaissance des ARNm cibles (Ding, Weiler et al. 2009).

Le turnover des miRNAs

Un autre niveau de régulation post-transcriptionnelle concerne le turnover des miRNAs. Bien qu'encore peu étudié, le turnover pourrait concerner tant les formes matures des miRNAs que les formes primaires et précurseurs. Il a été démontré que les miRNAs liés aux protéines Ago étaient plus stables en moyenne que les ARNm (leur temps de demi-vie est supérieur à 14h) ; cependant, certains miRNAs sont dégradés plus rapidement que d'autres, ce qui suggère une reconnaissance spécifique de la séquence des miRNAs par des nucléases (Kim, Han et al. 2009) ou tout au moins certaines propriétés thermodynamiques. Chez les plantes et les vers, il a été démontré que les protéines SDN (small RNA degrading nucleases) régulaient la stabilité des miRNAs. Néanmoins, à notre connaissance, aucune nucléase participant au turnover des miRNAs chez les animaux n'a été identifiée à ce jour (Kim et al., 2009, O'Connell et al., 2010, Kai and Pasquinelli, 2010).

L'édition des ARN

Les protéines ADARs (adenosine deaminases acting on RNA), qui interviennent dans l'édition des ARN (c'est-à-dire la conversion des adénines en inosines) et sont surexprimées en conditions inflammatoires, participent également au contrôle post-transcriptionnel de certains miRNAs (les miR-142 et -151 par exemple), comme l'illustre la figure 1.8. Dans ce cas, la modification de base engendrée par les ADAR entraîne une diminution de la reconnaissance du pri-miRNA ou du pre-miRNA par les ribonucléases Drosha et Dicer, ce qui altère leur maturation. Par ailleurs, on peut noter que le changement de base, s'il intervient au niveau de la séquence mature du miRNA, peut également affecter la spécificité des cibles reconnues par le miRNA (Ding et al., 2009).

La localisation subcellulaire des miRNAs

Il a été rapporté que les miRNAs pouvaient s'associer aux granules de stress ainsi qu'aux corps P (figure 1.7). Pauley et son équipe (Pauley et al., 2010) ont d'ailleurs démontré que la formation des corps P en condition basale nécessitait la biogenèse de miRNAs. De plus, ces chercheurs ont suggéré qu'une augmentation de l'activité des miRNAs serait associée à une augmentation du nombre et de la taille des corps P. Plus précisément, ils ont remarqué que la stimulation au LPS de cellules THP-1 résultait en la surexpression du miR-146a et dans une moindre mesure des miR-155 et miR-132 ainsi qu'en une augmentation du nombre et de la taille des corps P, lesquels sont enrichis en complexes miRISC. Selon les auteurs, cette expansion des corps P pourrait participer de façon directe ou indirecte à une meilleure inhibition des cibles des miRNAs, ou pourrait être la conséquence de l'accumulation des ARNm cibles en cours de dégradation (Pauley et al., 2010).

II. L'implication des miRNAs dans l'inflammation et les contextes dans lesquels les miR-132 et miR-212 ont été décrits

II.1. Les miRNAs et l'inflammation se régulent mutuellement

L'inflammation peut moduler à plusieurs niveaux l'expression des miRNAs en interagissant avec des acteurs moléculaires participant à leur régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (voir point I.3.). Inversement, les miRNAs modulent le développement et

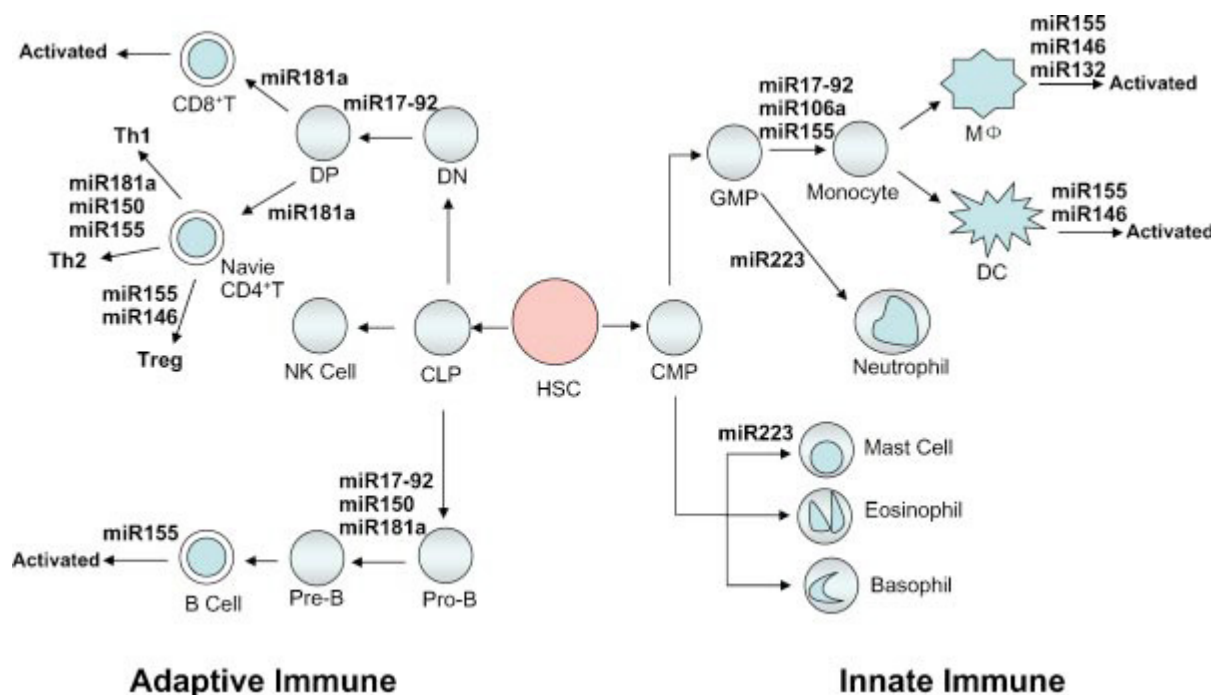


Figure 1.9 : MiRNAs majeurs impliqués dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules matures des systèmes immunitaires inné et adaptatif, ainsi que dans l'activation de ces cellules (Bi, Liu et al. 2009).

Disease	Dysregulated miRNAs
Rheumatoid arthritis	Downregulated in RA synovium tissue: miR-124a; upregulated in RA synovium tissue: miR-146a, miR-155, miR-203; upregulated in RA PBMCs: miR-16, miR-132, miR-146, miR-155; upregulated in RA CD4 ⁺ naive T-lymphocytes: miR-223
Systemic lupus erythematosus	Downregulated in SLE PBMCs: miR-146, miR-17-5p, miR-112, miR-141, miR-184, miR-196a, miR-383, miR-409-3p; upregulated in SLE PBMCs: miR-21, miR-61, miR-78, miR-142-3, miR-189 miR-198, miR-298, miR-299-3p, miR-342
Multiple sclerosis	Dysregulated in MS PBMCs: miR-18b, miR-599, miR-96
Primary biliary cirrhosis	Downregulated in PBC liver tissue: miR-26a, miR-122a; upregulated in PBC liver tissue: miR-299-5p, miR-328
Ulcerative colitis	Downregulated in the active UC tissue: miR-192
Psoriasis	Upregulated in psoriatic skin: miR-146 (in Tregs); miR-203

PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; Tregs, regulatory T cells.

Table 1.1 : Exemples de miRNAs dont l'expression dérégulée est associée à certaines maladies inflammatoires (Furer, Greenberg et al. 2010).

les réponses du système immunitaire, tant au niveau des réponses innées qu'adaptatives. Certains miRNAs jouent par exemple un rôle clé dans la réponse immune innée, comme les miR-155, miR-146 et miR-223, qui régulent la réponse inflammatoire aiguë résultant de la reconnaissance de pathogènes par les TLR (Toll-like receptors) (Bi et al., 2009). L'équipe de Baltimore a par exemple démontré que le miR-146, induit par le facteur de transcription NF- κ B lors de la stimulation de cellules THP-1 par du LPS, réprimait l'expression des protéines IRAK-1 (IL-1 (interleukin-1) receptor-associated kinase 1) et TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) impliquées dans la voie de signalisation du LPS et participait donc à une boucle de régulation négative de cette voie (Taganov et al., 2006). De nombreux miRNAs interviennent quant à eux dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules de l'immunité innée comme les granulocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules NK (natural killer) ou de l'immunité adaptative comme les lymphocytes B et T, ainsi que dans l'activation de ces dernières comme le résume la figure 1.9 (Bi et al., 2009, O'Connell et al., 2010). Etant donné les rôles de tous ces miRNAs dans l'homéostasie du système immunitaire, une expression anormale de ces importants régulateurs peut conduire à l'apparition de maladies auto-immunes ou inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, etc. A l'heure actuelle, toute une série de miRNAs dont l'expression est dérégulée ont ainsi été associés à ces pathologies (table 1.1) (Sheedy and O'Neill, 2008).

II.2. Les miR-132 et miR-212 ont été décrits dans des contextes divers

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié quelques aspects de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212 au sein de la lignée monocyttaire/macrophagique humaine THP-1 stimulée au LPS. Les rôles et le contrôle de l'expression de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire sont encore peu connus à l'heure actuelle. En revanche, ces miRNAs ont été plus largement étudiés au niveau neuronal, contexte dans lequel quelques éléments concernant leur régulation transcriptionnelle ont été élucidés. Il a également été rapporté que les miR-132 et miR-212 semblaient intervenir dans des mécanismes liés à la tumorigenèse et plusieurs études relevant d'autres thématiques ont proposé quelques rôles physiologiques pour ces miRNAs. Jusqu'à présent, et comme nous le décrirons progressivement, douze cibles ont été validées pour le miR-132 et six pour le miR-212, dont deux leurs sont communes (tables 1.2 et 1.3). Il semble important de noter que la région seed de ces deux miRNAs est identique, ce qui suggère qu'ils pourraient partager d'autres cibles (Remenyi et al., 2010). Toutefois, on sait actuellement que d'autres régions des miRNAs que leur région seed participent à la spécificité de reconnaissance des ARNm cibles (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Il n'est donc pas exclu que les miR-132 et -212 aient des cibles distinctes *in vivo* (Remenyi et al., 2010).

II.2.a. Les miR-132 et -212 dans le contexte inflammatoire

La première étude rapportant une induction du miR-132 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS date de 2006, époque à laquelle l'équipe de Baltimore a réalisé un screening des miRNAs induits par le LPS dans ce type cellulaire, révélant l'induction des miR-146a/b, miR-132 et miR-155. Ces chercheurs ont démontré que l'expression du miR-146a/b était contrôlée par le facteur de transcription NF- κ B, lui-même activé en aval de la voie de signalisation du TLR-4 déclenchée par la reconnaissance du LPS. De plus, comme ce fut cité précédemment, ils ont démontré que le miR-146 réprimait l'expression des protéines TRAF6 et IRAK-1 et

Cible		Type cellulaire, espèce et remarques éventuelles	Auteurs
p250GAP	GTPase-activating protein	Neurones corticaux de rats en période néonatale Neurones de l'hippocampe de rats	(Vo, Klein et al. 2005; Wayman, Davare et al. 2008)
RXF4	Regulatory factor X4	HEK293 (Human embryonic kidney)	(Cheng, Papp et al. 2007)
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein	Neurones corticaux de rats en période néonatale Cellules neuro-2a (+ observation d'une corrélation entre l'abondance de MeCP2 et du miR-132 dans des souris transgéniques exprimant le miR-132 de façon inductible)	(Klein, Liroy et al. 2007; Alvarez-Saavedra, Antoun et al. 2010)
AT1R	Récepteur de type 1 à l'angiotensine II	VSMC (vascular smooth muscle cells) humaines	(Elton, Kuhn et al. 2008)
AChE	Acétyl-choline estérase	Splénocytes murins	(Shaked, Meerson et al. 2009)
Sirt1	Sirtuin	Pré-adipocytes et adipocytes humains différenciés <i>in vitro</i>	(Strum, Johnson et al. 2009)
p300	Co-activateur transcriptionnel	HeLa et cellules endothéliales lymphatiques primaires humaines Cellules neuro-2a (+ corrélation entre l'abondance de p300 et du miR-132 dans des souris transgéniques exprimant le miR-132 de façon inductible)	(Alvarez-Saavedra, Antoun et al. 2010; Lagos, Pollara et al. 2010)
p120RasGAP	GTPase-activating protein	HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	(Anand, Majeti et al. 2010)
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9	HEK293 (+ corrélation entre l'abondance du miR-132 et celle de MMP-9 <i>in vivo</i> , chez la souris)	(Ucar, Vafaizadeh et al. 2010)
JARID1A	Jumonji, AT-rich interactive domain 1A	Cellules neuro-2a (+ corrélation entre l'abondance de JARID1A et du miR-132 dans des souris transgéniques exprimant le miR-132 de façon inductible)	(Alvarez-Saavedra, Antoun et al. 2010)
BTG2	B-cell translocation gene 2	Cellules neuro-2a (+ corrélation entre l'abondance de BTG2 et du miR-132 dans des souris transgéniques exprimant le miR-132 de façon inductible)	(Alvarez-Saavedra, Antoun et al. 2010)
PAIP2A	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	Cellules neuro-2a (+ corrélation entre l'abondance de PAIP2A et du miR-132 dans des souris transgéniques exprimant le miR-132 de façon inductible)	(Alvarez-Saavedra, Antoun et al. 2010)

Table 1.2 : Les cibles validées du miR-132.

Cible		Type cellulaire, espèce et remarques éventuelles	Auteurs
ZO-1	Zonula occludens 1	Cellules épithéliales intestinales humaines	(Tang, Banan et al. 2008)
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein	Lignées cellulaires de carcinomes gastriques humains	(Wada, Akiyama et al. 2009)
PED/PEA-15	Protéine antiapoptotique de la famille des DED (death effector domain)	Human non-small cell lung cancer	(Incoronato, Garofalo et al. 2010)
SPRED1	Sprouty-related, EVH1 domain containing 1	HEK293	(Hollander, Im et al. 2010)
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	Cellules de carcinomes squameux humains résistantes au cetuximab	(Hatakeyama, Cheng et al. 2010)
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9	HEK293 (+ corrélation entre l'expression du miR-212 et celle de MMP-9 <i>in vivo</i> , chez la souris)	(Ucar, Vafaizadeh et al. 2010)

Table 1.3 : Les cibles validées du miR-212.

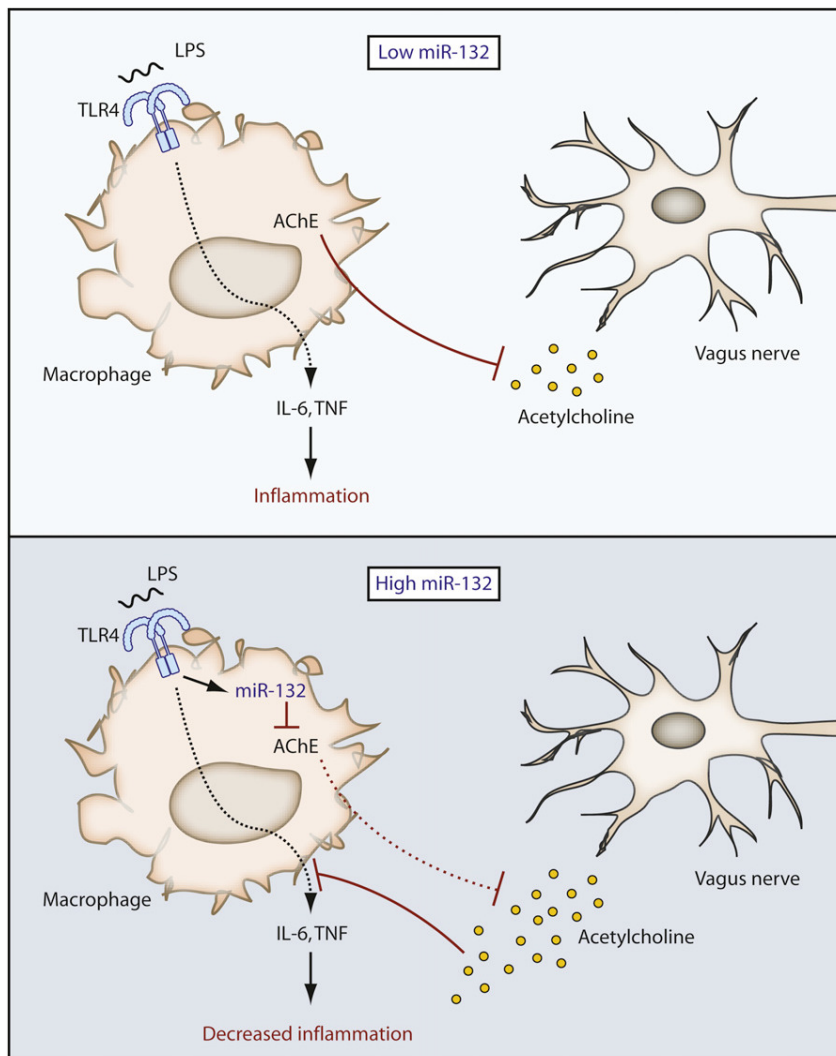


Figure 1.10 : Le miR-132 limite l'inflammation en ciblant l'acétylcholine estérase. Au-dessus : les stimuli pro-inflammatoires tels que la stimulation au LPS induisent la production de cytokines comme l'IL-6 ou le TNF via la voie du TLR-4. L'acétylcholine produite par le nerf vague tend à bloquer cette réponse ; néanmoins, la présence d'acétylcholine estérase contrecarre l'effet de l'acétylcholine, permettant de ce fait l'installation d'un processus inflammatoire. En dessous : le LPS induit l'expression du miR-132. Celui-ci, en ciblant l'acétylcholine estérase, permet une élévation des taux d'acétylcholine et ainsi, une diminution de l'inflammation (O'Neill 2009).

régulait de cette façon négativement la réponse inflammatoire. Néanmoins, ces chercheurs ne se sont intéressés ni aux processus régulant l'expression du miR-132, ni à ses cibles, ne fournissant dès lors aucune explication quant au rôle physiologique de l'induction de ce miRNA en réponse à la stimulation des cellules THP-1 par du LPS (Taganov et al., 2006).

Plus récemment, il a été rapporté que le miR-132 était aussi induit lors de la stimulation au LPS de macrophages humains primaires, de macrophages murins primaires provenant de la moelle osseuse et de la cavité intrapéritonéale ainsi que lors de l'injection de LPS dans un modèle murin *in vivo* (Shaked et al., 2009). Lors de cette dernière étude, Shaked et son équipe ont démontré que le miR-132 avait pour cible l'ARNm de l'acétylcholine estérase (AChE), et qu'il jouait donc un rôle direct dans l'inflammation. En effet, étant donné que l'AChE dégrade l'acétylcholine, un important inhibiteur de l'inflammation au niveau périphérique, la répression de l'AChE par le miR-132 permet de réprimer l'inflammation, comme l'illustre la figure 1.10. Le miR-132 pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la résolution de l'inflammation (O'Neill, 2009). Les auteurs de cette étude ont également suggéré que l'interaction entre le miR-132 et l'AChE pourrait avoir lieu dans le cerveau et de cette façon participer au fonctionnement et à la régulation des rythmes circadiens (Shaked et al., 2009). En effet, des pics d'expression de l'AChE sont observés durant les phases de sommeil, tandis que son expression est minimale durant les heures d'activité. A l'inverse, l'expression du miR-132 est plus élevée durant la journée. Confortant cette hypothèse, d'autres auteurs ont démontré un rôle du miR-132 dans la régulation de l'horloge interne, comme cela sera décrit ultérieurement (Cheng et al., 2007).

Des chercheurs ont démontré que le miR-132 était aussi induit lors de l'infection de cellules endothéliales lymphatiques (LEC) primaires humaines par le virus KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus), ainsi que lors de l'infection de monocytes THP-1 par les virus KSHV, HSV-1 (herpes simplex virus-1) et HCMV (human cytomegalovirus) (Lagos et al., 2010). L'induction du miR-132 dans ces contextes d'infection virale serait dépendante du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) activé par phosphorylation par les protéines kinases MAPK (mitogen-activated protein kinase) et SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase), elles-mêmes activées suite à la liaison du KSHV aux cellules. En ce qui concerne le rôle du miR-132 lors de l'infection virale, les auteurs ont démontré que ce miRNA avait pour cible le co-activateur transcriptionnel p300 (CREB se liant à p300 pour activer la transcription du miR-132, ceci pourrait expliquer la nature transitoire de l'induction du miR-132 suite à l'infection virale) ; or cette protéine, ainsi que CBP (CREB binding protein) sont essentielles à l'initiation de la réponse antivirale. CBP et p300 sont deux protéines fortement apparentées appartenant à une famille de protéines co-activatrices conservées au cours de l'évolution. Ces protéines peuvent non seulement intervenir dans les processus transcriptionnels en créant des ponts entre les facteurs de transcription et la machinerie basale de transcription mais également en exerçant une fonction d'histone acétyltransférase leur permettant de participer au remodelage de la chromatine (Vo and Goodman, 2001). En outre, ces protéines modulent et connectent entre elles différentes voies de signalisation, ce qui leur permet de participer à toute une série de processus cellulaires. Au niveau de l'inflammation, les co-activateurs CBP et p300 semblent particulièrement importants, étant donné qu'ils interagissent avec des protéines « clés » de la réponse inflammatoire, comme les facteurs de transcription NF- κ B, les membres de la famille AP-1 (activating protein 1) c-Fos, c-Jun, ATF-1 (activating transcription factor 1) et ATF-4, ou encore STAT-1 et CREB (Matt, 2002). Dans le contexte de l'étude publiée par Lagos *et al.*, la surexpression du miR-132 faciliterait la réplication virale en inhibant l'expression des gènes stimulés par la réponse interféron. Il est d'ailleurs intéressant de noter que p300 et CBP

sont des cibles communes au virus KSHV ainsi qu'à d'autres virus à ADN oncogéniques suite à l'inhibition desquelles ces virus échappent à l'immunité innée (Lagos et al., 2010). Etant donné que le miR-132 est surexprimé dans les cellules THP-1 stimulées au LPS, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de p300 pourrait également être réprimée par ce miRNA dans ce type cellulaire et que p300 pourrait, tout comme l'ont suggéré Lagos et son équipe, participer à des boucles de régulation de la transcription des miR-132 et miR-212. En effet, p300 intervient dans la transactivation de gènes régulés par NF- κ B, AP-1 et CREB. Or, l'expression des miR-132 et -212 se trouve sous le contrôle d'un promoteur comportant des sites consensus putatifs pour ces facteurs de transcription. C'est pourquoi nous avons étudié, au cours de ce mémoire, l'expression de p300 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS de façon à déterminer si elle pouvait participer à la régulation transcriptionnelle de ces deux miRNAs.

D'un point de vue clinique, l'équipe de Pauley (Pauley et al., 2008) a mis en évidence que les miR-146a, miR-155, miR-132 et miR-16 étaient surexprimés dans les cellules mononuclées du sang périphérique de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, par comparaison avec des individus sains. En outre, ces chercheurs ont montré que la surexpression des miR-146a, miR-155 et miR-132 était stable durant une période de plus de deux mois chez un patient atteint de la maladie ne démontrant pas d'amélioration suite à un traitement au methotrexate. Ceci suggère que l'expression élevée de ces miRNAs pourrait refléter l'absence de réponse du patient au traitement, bien que ces études devraient être confirmées sur une population de patients plus grande. Par ailleurs, cette équipe a également démontré que parmi les différentes sous-populations de cellules mononuclées du sang périphérique, les monocytes et macrophages étaient responsables de la surexpression des miRNAs. En effet, les miR-146a, miR-155, miR-16 et particulièrement le miR-132 sont surexprimés dans les monocytes par rapport aux lymphocytes. L'équipe de Murata *et al.* (Murata et al., 2010) s'est quant à elle intéressée à l'expression des miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 et miR-223 dans les liquides synoviaux et dans le plasma de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite, dans le but de déterminer si le lieu et l'intensité de l'expression d'un miRNA pouvaient servir de biomarqueur de l'une de ces deux maladies. Ils ont ainsi découvert que les concentrations synoviales des miR-16, miR-146a, miR-155 et miR-223 étaient plus élevées chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde que chez ceux atteints d'ostéoarthrite, tandis que la concentration plasmatique du miR-132 était plus élevée chez les personnes saines que chez les patients atteints de ces maladies inflammatoires. Les résultats *à priori* contradictoires obtenus par ces deux équipes pourraient être expliqués par le fait que les études de Pauley *et al.* ont été réalisées sur des cellules, tandis que celles de Murata ont été réalisées sur du plasma et du liquide synovial. Or, Murata et ses collègues ont démontré que les synoviocytes fibroblastiques et les tissus synoviaux « sécrètent » le miR-132 à une concentration relativement élevée (il n'est en réalité pas encore bien compris comment les miRNAs sont produits dans le plasma et le liquide synovial), alors que les cellules mononuclées ne « sécrètent » le miR-132 qu'à un très faible taux. En outre, ils ont également suggéré que si les miRNAs des fluides synoviaux provenaient essentiellement des tissus synoviaux et des cellules les infiltrant, en revanche, les miRNAs plasmatiques seraient générés par différents tissus et non dérivés des cellules mononuclées uniquement.

II.2.b. Les miR-132 et -212 dans le contexte neuronal

En 2005, Vo et ses collègues (Vo et al., 2005) ont identifié le miR-132 comme étant une cible du facteur de transcription CREB grâce à une approche dénommée SACO (Serial Analysis of

Chromatin Occupancy) permettant d'identifier les transcrits non codants et miRNAs auxquels sont associés des sites de liaison pour CREB¹. Ce facteur de transcription a été jusqu'à présent largement étudié dans le contexte neuronal ; il est activé lors de la maturation et de la plasticité neuronale, joue un rôle régulateur clé dans la formation de la mémoire ainsi que dans les réponses comportementales adaptatives et participe à la régulation des rythmes circadiens et à la différenciation des neurones périphériques dépendante des neurotrophines (Vo et al., 2005). Etant donné que le miR-132 est fortement induit par les neurotrophines et que sa transcription dans ce contexte dépend de CREB, les chercheurs se sont intéressés aux rôles de ce miRNA dans la différenciation et la plasticité neuronale. Ils ont ainsi démontré que le miR-132 jouait un rôle clé dans la morphogenèse des neurones corticaux en réprimant l'expression de p250 GAP (GTPase-activating protein), une protéine impliquée dans la régulation de la différenciation neuronale (Vo et al., 2005). En outre, Wayman et ses collègues (Wayman et al., 2008) ont confirmé trois ans plus tard que le miR-132, également induit par l'activité neuronale, participait à la morphologie dendritique des neurones de l'hippocampe en réprimant cette même protéine. L'importance du miR-132 dans le développement et la maturation des dendrites a en outre été confirmée par la même équipe, *in vivo*, chez la souris (Magill et al., 2010). Par ailleurs, le miR-132 interviendrait également dans la plasticité dendritique en modulant l'expression d'une autre cible, MeCP2 (methyl CpG-binding protein 2) (Klein et al., 2007). En effet, il a été observé qu'une diminution de l'expression de cette protéine durant la période post-natale retardait la formation des synapses neuronales tandis que sa surexpression entraînait l'arborisation des dendrites et axones. Le miR-132 permettrait donc de maintenir les taux de protéines MeCP2 constants dans les neurones afin de permettre un développement neuronal contrôlé (Klein et al., 2007). Nudelman et ses collègues (Nudelman et al., 2010) ont quant à eux démontré que la forme primaire du miR-132 et dans une moindre mesure sa forme mature étaient également induites *in vivo* suite à l'exposition de souris à des stimuli neuronaux. Selon les auteurs, le miR-132, qui est spécifiquement localisé au niveau des synapses actives, pourrait jouer un rôle dans l'activation à plus long terme des synapses et contribuer à la mémorisation. Ainsi, en régulant de façon étroite l'expression de la protéine MeCP2, le miR-132 pourrait être particulièrement important pour le développement et le fonctionnement du cerveau (Nudelman et al., 2010).

Il est intéressant de noter, cependant, que Wibrand et ses collègues (Wibrand et al., 2010), qui ont observé une induction des miR-132 et -212 lors de la potentialisation à long terme par stimulation à haute fréquence du gyrus dentatus² de rats adultes, n'ont pas observé de changements de l'expression des protéines MeCP2 et p250 GAP. La transcription des miR-132 et miR-212 dépendrait dans ce contexte d'une cascade de signalisation activée en aval d'un autre récepteur que dans les cas précédents (récepteur au glutamate métabotrope (mGluR) au lieu du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR)) (Wayman et al., 2008, Wibrand et al., 2010). Ceci suggère que les mécanismes induisant la transcription des miR-132 et -212, ainsi que les effets induits par ces miRNAs sur le protéome, seraient différents selon le stade de développement.

Cheng et ses collègues (Cheng et al., 2007) ont quant à eux remarqué que l'expression du miR-132 dans les noyaux suprachiasmatiques était étroitement régulée par la lumière et

¹ La même approche a également été employée par Conaco *et al.* pour identifier les miRNAs régulés par le répresseur transcriptionnel REST (RE1 silencing transcription factor). Ces auteurs ont ainsi identifié un site RE situé juste en amont du miR-132 dans une lignée cellulaire murine rénale (TCMK1) ; néanmoins, leurs recherches se sont portées sur le miR-124a.

² Structure du cerveau située au niveau de l'hippocampe et impliquée dans les fonctions d'apprentissage (www.futura-sciences.com/fr/definition/.../gyrus-dente_161/ -).



Figure 1.11 : Localisation des sites CRE impliqués dans l'induction des miR-212 et miR-132 murins en réponse aux neurotrophines dans les neurones corticaux. Les losanges gris représentent la localisation des miR-212 (à gauche) et miR-132 (à droite) ; les flèches blanches représentent les sites CRE étudiés au cours de l'étude de Remenyi ; et les rectangles gris représentent les exons 1 (à gauche) et 2 (à droite) du gène non codant hébergeant les séquences des miR-212 et miR-132 murins (Remenyi, Hunter et al. 2010).

dépendante du facteur de transcription CREB. Or, ce facteur est connu pour jouer un rôle central dans les changements d'expression de gènes dépendant de la lumière. Ces chercheurs se sont donc intéressés au rôle potentiel que pourrait jouer le miR-132 dans les rythmes circadiens. Ils ont ainsi démontré que le miR-132 réprimait l'expression de la protéine RFX4 (regulatory factor X4, un facteur de transcription fortement exprimé dans les noyaux suprachiasmatiques et induit lors de l'exposition nocturne à la lumière) et qu'il pourrait intervenir dans une boucle de régulation négative de la réponse à la lumière. Plus récemment, il a été démontré que le miR-132 modulait l'expression des gènes *period*, *mPer1* et *mPer2* (ces gènes participent à la régulation de l'horloge interne) en réprimant l'expression de cinq cibles : MeCP2, p300, JARID1A (Jumonji, AT-rich interactive domain 1A) (également connue sous le nom de « retinoblastoma binding protein 2 »), BTG2 (B-cell translocation gene 2) et PAIP2A (polyadenylate-binding protein-interacting protein 2). Le miR-132 assurerait donc le contrôle de l'horloge interne en orchestrant le remodelage de la chromatine (via MeCP2, p300 et JARID1A) et en réprimant la traduction protéique (via BTG2 et PAIP2A) des gènes *period* au niveau des noyaux suprachiasmatiques (Alvarez-Saavedra et al., 2010).

Si le rôle de CREB dans la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212 avait déjà été suggéré à plusieurs reprises au cours des années précédentes (Wayman et al., 2008, Cheng et al., 2007, Nudelman et al., 2010, Vo et al., 2005, Lagos et al., 2010) et démontré dans une publication (Vo et al., 2005), ce n'est qu'au cours de cette année que Remenyi et son équipe (Remenyi et al., 2010) ont analysé plus en détails le rôle de ce facteur de transcription dans l'induction des deux miRNAs suite à une stimulation neuronale. Ces chercheurs ont montré que l'induction des miR-132 et -212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) était dépendante de l'activation des kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) et partiellement liée à l'activation de CREB en aval de ces kinases. Chez la souris, quatre sites CRE (cAMP response elements) semblent intervenir, au moins en partie, dans la transcription des miR-132 et -212. Trois de ces quatre sites sont localisés au sein de l'intron 1 du gène non codant hébergeant les séquences des miR-132 et miR-212 (figure 1.11) et sont associés à une forte diminution de l'expression des deux miRNAs lorsqu'ils sont mutés ; en revanche, le site CRE situé en amont de l'exon 1, au sein d'une région conservée chez l'homme et la souris, n'induit pas à lui seul une diminution de l'expression des deux miRNAs lorsqu'il est muté. Il semble donc que les éléments les plus déterminants dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et -212 soient localisés dans l'intron 1 du gène encodant ces miRNAs chez la souris (Remenyi et al., 2010).

Toujours dans un contexte neuronal, il a également été démontré cette année que le miR-212, et dans une moindre mesure le miR-132, régulaient eux-mêmes l'activité du facteur de transcription CREB ainsi que celle de son co-activateur TORC (transducer of regulated CREB). Le miR-212, en réprimant l'expression de protéines limitant l'activité de Raf1 comme SPRED1 (sprouty-related, EVH1 domain containing 1), induit une augmentation de l'activité de Raf1. Etant donné que les protéines GTPases Raf1 régulent l'activité des adénylyl cyclases, la surexpression du miR-212 conduit à une élévation de la production d'AMP cyclique, permettant elle-même l'activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB ainsi qu'une augmentation de l'expression du co-activateur TORC (Hollander et al., 2010).

II.2.c. Les miR-132 et miR-212 dans le cadre du cancer

Selon plusieurs études récentes, le miR-212 serait associé à certaines fonctions dans les cellules cancéreuses. Tout d'abord, l'équipe de Wada (Wada et al., 2009) a découvert que le miR-212 était moins exprimé dans les lignées de cellules de carcinomes gastriques que dans les cellules issues de tissus gastriques non cancéreux. Or, ces chercheurs ont montré que la transfection de précurseurs du miR-212 dans les cellules de carcinomes gastriques induisait une diminution de leur croissance. Ces observations suggèrent que le miR-212 exercerait un rôle de suppresseur de tumeur. Bien que deux cibles prédites du miR-212, E2F5 et SIRT1 (cette seconde cible a été validée pour le miR-132 dans un autre contexte au cours de la même année, comme cela sera décrit ultérieurement) pourraient participer à l'effet du miR-212 sur la carcinogenèse, ce miRNA ne semble pas pouvoir cibler les ARNm de ces deux protéines dans les cellules de carcinomes gastriques. Néanmoins, Wada et ses collègues ont mis en évidence que le miR-212 réprimait l'expression de MeCP2, une protéine également régulée par le miR-132 (voir point précédent) (Klein et al., 2007). La protéine MeCP2 représente un composant clé de la machinerie de méthylation de l'ADN ; or, l'hyperméthylation de l'ADN est associée à une tumorigenèse accrue. De plus, il a été mis en évidence que la répression de MeCP2 dans les cellules de cancer de la prostate provoquait une augmentation de l'expression de GADD45 α (growth arrest and DNA damage 45 α), une protéine capable de bloquer la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G2-M (Ramachandran et al., 2009). Etant donné que la transfection de cellules de carcinomes gastriques avec des précurseurs du miR-212 induit une plus forte expression de GADD45 α , il semble que le miR-212 intervienne dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire.

Une autre étude est également arrivée à la conclusion que le miR-212 exercerait des fonctions de suppresseur de tumeur, en identifiant cette fois une cible impliquée dans l'apoptose. Il s'agit de la protéine antiapoptotique PED/PEA-15, un membre de la famille des protéines à domaine de mort effecteur (DED, death effector domain) intervenant dans la croissance cellulaire et le métabolisme. Incoronato et son équipe (Incoronato et al., 2010) ont identifié cette cible *in vitro* dans des cellules cancéreuses du poumon (NSCLC, non-small cell lung cancer) et ont démontré que le miR-212 était moins exprimé dans les cellules provenant de biopsies humaines de cancer du poumon que dans les biopsies provenant d'individus sains. De plus, dans ces cellules, l'expression du miR-212 est inversement corrélée à celle de sa cible PED/PEA-15 mais aussi à la réponse des cellules au traitement au tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ceci concorde avec l'observation selon laquelle les cellules surexprimant PED/PEA-15 ont un phénotype de résistance au TRAIL. D'autres études ont également corrélié l'expression de la protéine PED/PEA-15 à la résistance aux traitements anti-cancéreux. Stassi *et al.* (Stassi et al., 2005) par exemple ont démontré que la surexpression de PED/PEA-15 dans le cadre du cancer du sein induisait une résistance aux agents chimiothérapeutiques. Par ailleurs, Rui *et al.* (Rui et al., 2010) ont remarqué que l'expression réduite du miR-212 dans les cellules cancéreuses du poumon était corrélée à leur résistance au docetaxel. Bien que lors de cette dernière étude, l'acteur moléculaire de la résistance n'ait pas été identifié, Incoronato et ses collègues proposent que PED/PEA-15 pourrait jouer un rôle dans ce processus. En réprimant PED/PEA-15, le miR-212 agirait donc en tant que suppresseur de tumeur et sa répression serait associée à une résistance aux traitements anti-cancéreux (Incoronato et al., 2010).

Une troisième étude publiée cette année a également suggéré un rôle de la répression du miR-212 dans la résistance à un traitement cancéreux. Hatakeyama et ses collègues ont en effet remarqué que le miR-212 était moins exprimé dans les cellules de carcinomes squameux de la

tête et du cou résistantes au cetuximab³ que dans les cellules sensibles. La répression du miR-212 dans les cellules résistantes induirait une augmentation de l'expression de sa cible, l'HB-EGF (heparin-binding EGF (epidermal growth factor)-like growth factor) ; or l'expression de cette dernière est corrélée à la résistance au cetuximab (Hatakeyama et al., 2010).

A l'heure actuelle, les mécanismes responsables de la diminution de l'expression du miR-212 dans les cellules cancéreuses humaines ne sont pas encore connus. Néanmoins, le miR-212 est localisé sur le chromosome 17 au niveau de la région p13.3 ; or, cette région est souvent délétée dans les cellules de cancer du poumon (Konishi et al., 2003) et de cancer gastrique (Yustein et al., 1999).

Wong et ses collègues ont quant à eux remarqué lors d'un screening que le miR-132 était surexprimé dans les cellules de carcinomes squameux de la langue par rapport aux tissus sains (Wong et al., 2008). Néanmoins, ni les causes ni les conséquences de l'induction de ce miRNA dans ce contexte ne sont établies pour le moment. En revanche, il a été démontré que le miR-132 était aussi surexprimé dans les cellules endothéliales mises en présence de milieu conditionné de cellules tumorales. Dans ce contexte, le miR-132 participerait au switch angiogénique en stimulant la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes via la répression de la protéine p120RasGAP (Anand et al., 2010).

II.2.d. Autres contextes dans lesquels les miR-132 et -212 ont été décrits

En dehors des contextes précédemment décrits, il a été démontré que les miR-132 et -212 étaient fortement induits lors de la stimulation de cellules de la granulosa par la LH (hormone lutéinisante) et l'hCG (gonadotrophine chorionique humaine) en période péri-ovulatoire chez la souris (Fiedler et al., 2008). La surexpression de ces miRNAs serait aussi liée dans ces cellules à la voie de signalisation dépendante de l'AMP cyclique et à l'activation de CREB. Parallèlement à cette observation, Yuen et son équipe (Yuen et al., 2009) ont démontré que les miR-132 et -212 étaient induits lors de la stimulation de cellules gonadotropes par de la gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Néanmoins, les rôles des miR-132 et -212 dans les cellules ovariennes et gonadotropes ne sont pas encore connus actuellement. Toujours dans un contexte hormonal, il a récemment été démontré que les miR-132 et miR-212 étaient indispensables au développement des glandes mammaires chez la souris. En effet, en régulant l'expression de leur cible MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), les miR-132 et miR-212 contrôlent le dépôt de collagène et donc les interactions entre les cellules épithéliales et le stroma, lesquelles sont requises pour la formation et la croissance des canaux de la glande mammaire lors de la puberté (Ucar et al., 2010). En dehors de l'identification de cette nouvelle cible, il est intéressant de souligner qu'au cours de cette étude, les chercheurs ont identifié un nouveau transcrit encodant les miR-132 et miR-212. En effet, bien qu'il était précédemment admis que les séquences des miR-132 et miR-212 étaient situées au sein de l'intron 1 d'un gène non codant chez la souris, Ucar et ses collègues ont remarqué que les séquences de ces miRNAs étaient localisées dans l'exon 2 d'un variant d'épissage alternatif (figure 1.4). Alors que les deux isoformes sont exprimées dans le cerveau, seul ce nouveau variant serait exprimé dans les glandes mammaires. Ces deux isoformes présentent donc des caractéristiques d'expression tissulaire différentes.

³ Le cetuximab est un traitement à base d'anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR (epidermal growth factor receptor) administré en monothérapie ou en combinaison à de la radio- ou chimio-thérapie aux patients atteints de carcinomes squameux de la tête et du cou.

L'équipe de Tang *et al.* a récemment découvert que le miR-212 était induit par l'exposition à l'éthanol de cellules épithéliales intestinales humaines mais aussi dans les biopsies de colon de patients atteints d'ALD (alcoholic liver disease) (Tang et al., 2008). Dans ces cellules et tissus, le miR-212 inhiberait l'expression de la protéine ZO-1 (zonula occludens 1) et perturberait de cette façon l'intégrité des épithélia.

Il a également été rapporté que le miR-132 était induit lors de la privation en sérum de pré-adipocytes et d'adipocytes humains différenciés *in vitro* (Strum et al., 2009). Dans ces cellules, la surexpression du miR-132 conduit à une élévation de la production des chémokines IL-8 (interleukine 8) et MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) ainsi qu'à l'acétylation de la lysine 310 de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B). Cet effet du miR-132 sur l'acétylation de p65 serait expliqué par le fait que le miR-132 réprime l'expression de la désacétylase SirT1 dans les pré-adipocytes et adipocytes, permettant de cette façon d'augmenter l'activité de NF- κ B et d'activer la production de chémokines. Les protéines Sirtuin sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. En effet, ces histones désacétylases (HDAC) de classe III, qui requièrent la présence du cofacteur NAD (nicotinamide adénosine dinucléotide), ont pour fonction de désacétyler différents substrats, comme les histones mais aussi d'autres protéines telles que les co-activateurs CBP et p300 ainsi que la sous-unité RelA/p65 du facteur de transcription NF- κ B. Ceci permet aux protéines SirT1 de réguler certains processus métaboliques, de participer à la résistance aux stress et à la survie des cellules, au vieillissement et à la sénescence cellulaire, aux fonctions endothéliales, aux rythmes circadiens, à l'inflammation et aux fonctions immunes (Chung et al., 2010b). Etant donné que le miR-132 est induit lors de la stimulation au LPS de cellules THP-1, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de ce mémoire, à l'expression de cette protéine afin de déterminer si elle était également réprimée par le miR-132 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. En effet, il a été rapporté que l'expression et l'activité de cette protéine était diminuée dans les macrophages de rats et de souris stimulés au LPS (Shen et al., 2009) et qu'il en résultait une augmentation de la capacité de trans-activation du facteur NF- κ B et donc de l'expression de gènes pro-inflammatoires. Nous avons donc émis l'hypothèse que la surexpression du miR-132 qui résulte de la stimulation au LPS pourrait réprimer l'expression de SirT1 dans les cellules THP-1. Par ailleurs, étant donné que les deux miRNAs dont nous avons étudié l'expression, les miR-132 et -212, pourraient être sous le contrôle des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, dont l'activité est régulée par SirT1 (Yeung et al., 2004, Chung et al., 2010a, Gao and Ye, 2008), cette cible se révélait particulièrement intéressante à étudier étant donné qu'elle pourrait participer, tout comme p300, à des boucles de régulation de l'activité de ces facteurs de transcription.

III. Les voies de signalisation induites par le LPS

Afin de comprendre comment les miR-132 et -212 sont induits par le LPS dans les cellules THP-1, il semble adéquat de revoir brièvement les principales cascades de signalisation cellulaire activées par le LPS. En effet, les analyses bioinformatiques réalisées sur la région promotrice putative des miR-132 et -212 permettent d'identifier de très nombreux facteurs de transcription participant potentiellement à la régulation de l'expression de ces miRNAs. Néanmoins, les candidats proposés par ce type d'approche sont trop nombreux que pour pouvoir être tous testés expérimentalement. Dès lors, afin de sélectionner les candidats les plus pertinents dans l'induction des miR-132 et -212 en réponse au LPS, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation activées par cette molécule.

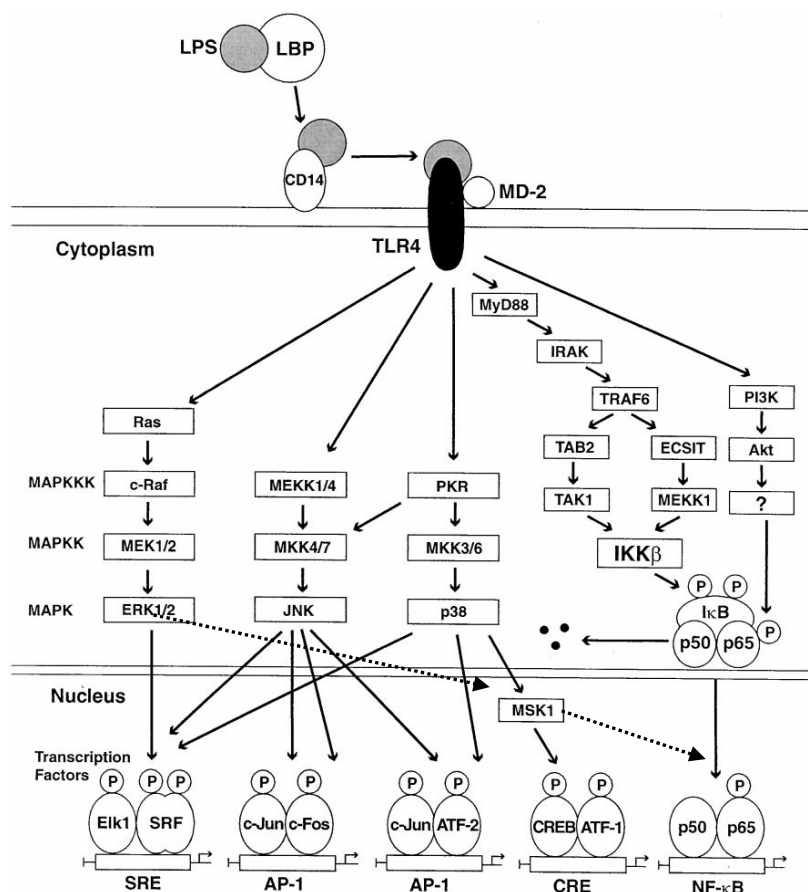


Figure 1.12 : Les voies de signalisation induites par le LPS dans les monocytes. Après avoir lié la protéine LBP, le LPS est amené à la surface des cellules et interagit avec les récepteurs CD14 puis avec les TLR-4 et leur protéine accessoire MD-2. Ceci induit l'activation de la voie des IKK, menant à l'activation du facteur de transcription NF-κB, ainsi qu'à l'activation des voies MAPK ERK1/2, JNK et p38, aboutissant elles-mêmes à l'activation de nombreux facteurs de transcription dont Elk1, SRF, c-Jun, c-Fos, ATF-2 et CREB. Cette figure est issue de la référence suivante (Guha and Mackman 2001) et adaptée d'après (Remenyi, Hunter et al. 2010) et (Vermeulen, Berghe et al. 2009).

III.1. Les PAMPs et TLR

Les cellules immunes, auxquelles appartiennent entre autres les monocytes et macrophages, disposent à leur surface de senseurs appelés TLR leur permettant de déceler la présence de pathogènes et d'initier, suite à leur détection, les réponses immunes innées et adaptatives (Liew et al., 2005). Les TLR, dont il existe dix membres chez l'homme (Doyle and O'Neill, 2006), ont été conservés au cours de l'évolution afin de reconnaître les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), des motifs « typiques » issus de divers pathogènes tels que les virus, bactéries, champignons ou encore les parasites et traduisant leur présence. Le lipopolysaccharide, composant majeur de la paroi externe des bactéries gram négatives, constitue un exemple de PAMP reconnu à la surface des cellules immunes par les récepteurs TLR-4.

Lorsque les TLR détectent la présence d'un PAMP, ils dimérisent pour former des homodimères (c'est notamment le cas du TLR-4) ou des hétérodimères et rapprochent de cette façon leurs domaines cytoplasmiques TIR (Toll/interleukin-1 receptor) (Liew et al., 2005). Il s'ensuit l'activation de diverses cascades de signalisation cellulaire, menant principalement à l'activation des protéines kinases activées par les stress et du facteur de transcription NF- κ B (Liew et al., 2005, Doyle and O'Neill, 2006). Ce dernier induit ensuite la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (tumor necrosis factor- α), l'IL-1 et l'IL-2, dont la libération reflète l'état d'activation de la réponse immune innée au sein des cellules (Doyle and O'Neill, 2006).

III.2. L'activation des réponses cellulaires au LPS

III.2.a. L'activation du facteur de transcription NF- κ B via les voies dépendantes et indépendantes de MyD88

Lors d'une infection par des bactéries gram-négatives, le LPS contenu dans la paroi de celles-ci est complexé par une protéine plasmatique, la LPS-binding protein (LBP) qui, une fois opsonisée, est reconnue à la surface des cellules par le récepteur CD14. Ceci permet au LPS d'être lié par le TLR-4 et sa protéine accessoire MD-2 (Guha and Mackman, 2001), comme l'illustre la figure 1.12. Suite à leur activation, les TLR-4 dimérisent et recrutent la protéine adaptatrice MyD88 au niveau de leurs domaines TIR cytoplasmiques. MyD88 induit alors elle-même, via son domaine de mort (death domain), le recrutement des protéines kinases IRAK-4 et 1 (IL-1 receptor-associated kinases), qui possèdent un domaine identique. Ceci permet aux IRAK-4 d'activer les IRAK-1 par phosphorylation. Ces dernières, une fois phosphorylées, se détachent du complexe récepteur et vont activer les protéines TRAF6. Les complexes IRAK-1-TRAF6 se dirigent ensuite vers la membrane, au niveau de laquelle se situent des complexes formés de protéines TAK1 (TGF- β activated kinase) chacune associée à deux protéines TAB (TAK1-binding protein), TAB1 et TAB2. Des réactions d'ubiquitination de TRAF6 et de son substrat TAK1 ont lieu et sont suivies par la phosphorylation des protéines TAK1 et TAB2. Il s'ensuit la dégradation d'IRAK-1, le détachement du complexe protéique de la membrane ainsi que l'activation de TAK1, qui peut alors phosphoryler ses propres cibles, telles que les kinases I κ B (IKK). Ces dernières, en phosphorylant les protéines I κ B, induisent leur dégradation et permettent de cette façon la

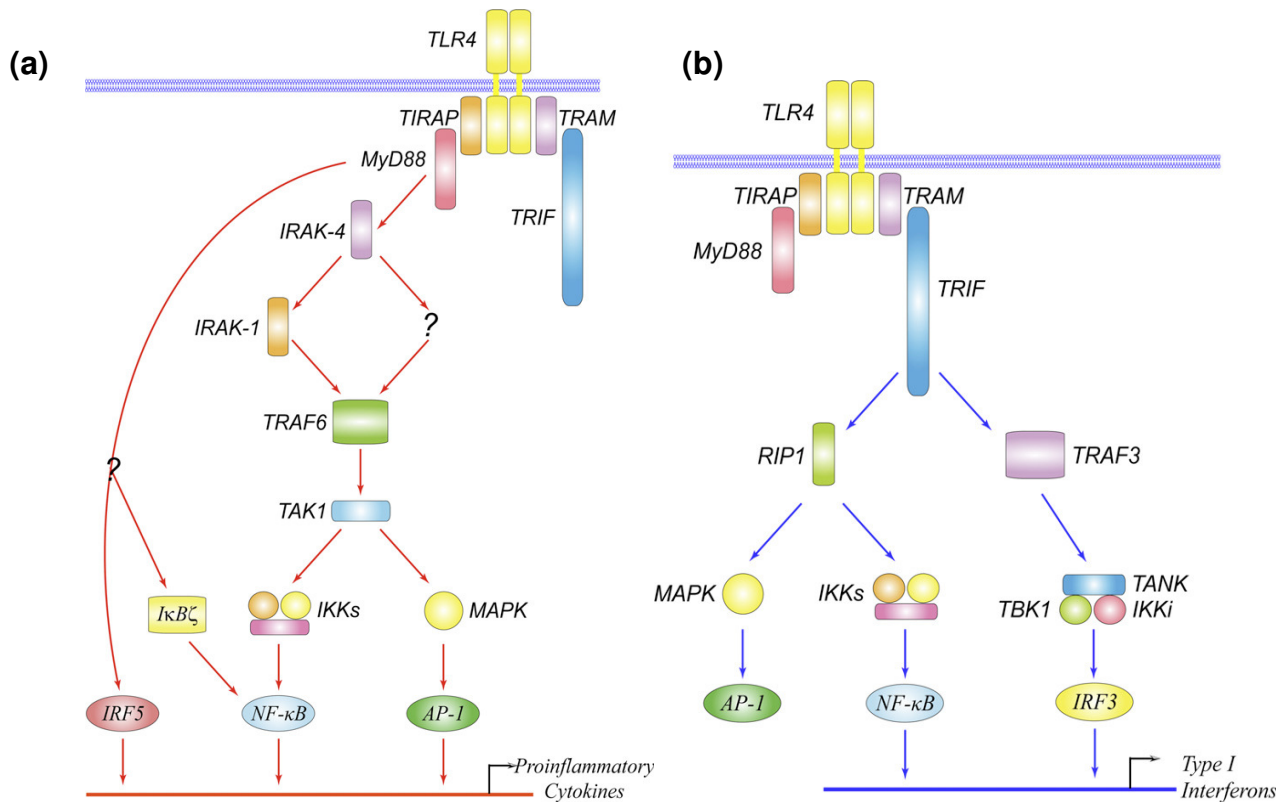


Figure 1.13 : Les voies de signalisation activées par le TLR-4 suite à la reconnaissance de LPS. (a) Comme déjà illustré à la figure précédente, la voie des IKK activée via MyD88, les IRAK, TRAF6 et TAK1 peut aboutir à l'activation du facteur de transcription NF-κB tandis que les MAPK activées en aval de TRAF6 mènent entre autres à l'activation du facteur de transcription AP-1. (b) En outre, il existe une voie de signalisation en aval du TLR-4 indépendante de MyD88, impliquant les protéines TRIF, TRAM et TBK1. Cette voie permet notamment l'activation du facteur IRF3 (Lu, Yeh et al. 2008).

translocation du facteur de transcription NF- κ B vers le noyau au niveau duquel il peut induire la transcription de ses gènes cibles. Le facteur de transcription NF- κ B peut également être activé en aval du TLR-4 par une voie indépendante de MyD88. Cette voie implique le recrutement des protéines adaptatrices TRAM (TRIF-related adapter molecule) au niveau des domaines TIR des TLR-4, puis des protéines TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β). Ces dernières recrutent et activent TRAF6, ce qui mène à l'activation de TAK1 puis de NF- κ B d'une façon indépendante d'IRAK-4 et 1, ou à celle de TBK1 (TANK-binding kinase-1) et d'IKK non canoniques aboutissant à l'activation du facteur IRF3 (interferon regulatory factor 3) (figure 1.13) (Doyle and O'Neill, 2006, Lu et al., 2008).

III.2.b. L'activation des MAPK ERK1/2, JNK et p38

En ce qui concerne les MAPK, il a été démontré que la stimulation de monocytes et de macrophages par du LPS induisait l'activation des trois voies MAPK, ERK1/2, JNK et p38, chacune de celles-ci menant à l'activation de plusieurs facteurs de transcription. Ces voies seraient notamment activées en aval des protéines kinases C typiques et atypiques, de certains membres de la famille des tyrosines kinases *src* ainsi que d'autres molécules impliquées dans la signalisation cellulaire.

La voie MEK1/2 – ERK1/2 est activée en aval de Ras et c-Raf, et, comme l'illustre la figure 1.12, conduit entre autres à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 (Ets-like transcription factor-1). Celui-ci lie l'ADN au niveau de motifs Ets (E-twenty six) à proximité desquels se trouvent des éléments SRE liés par des dimères de facteurs de transcription SRF (serum response factor). Il en résulte la formation d'un complexe ternaire Ets/SRF/SRF activant la transcription des gènes cibles. La voie des JNK, également connue sous le nom de SAPK1 est activée via plusieurs MAPKKK (telles que MEKK1 et MEKK4) et conduit à l'activation de divers facteurs de transcription tels que Elk-1, ATF-2 et c-Jun, qui contrôlent la transcription de médiateurs inflammatoires. Enfin, la troisième voie MAPK communément appelée p38, est activée en aval de Cdc42, PAK et Rac1 via les MAPKKK PKR, MLK3/SPRK, ASK1 ou TAK1. Une fois activée à son tour, la kinase p38 phosphoryle et active divers facteurs de transcription, dont Elk-1 et ATF-2 (également activés en aval de la voie des JNK), CHOP, MEF2C et Sap1a (Guha and Mackman, 2001).

Outre le fait que chacune des MAPK décrites ci-dessus puisse directement réguler l'activité de facteurs de transcription, les kinases p38 et ERK1/2 activent également d'autres protéines kinases, les MSK (mitogen- and stress-activated protein kinases). L'importance et le rôle de ces protéines dans l'expression des gènes inflammatoires sont à ce jour bien établis ; les MSK1 activées par les MAPK p38 ou ERK1/2 en aval de la voie de signalisation du LPS contrôlent la transcription de gènes pro-inflammatoires en activant par phosphorylation les facteurs de transcription CREB, ATF-1, ainsi que la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B. En outre, les protéines MSK2 et dans une moindre mesure MSK1 peuvent induire, notamment en réponse au LPS, l'activation de l'expression de certains gènes en phosphorylant le résidu sérine 10 des protéines histones 3 et en relâchant de cette façon la structure de la chromatine (Vermeulen et al., 2009).

III.2.c. Les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et CREB

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans l'inflammation en participant à la régulation de l'expression de la majorité des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs de l'inflammation. Ce facteur de transcription est formé d'un complexe homo- ou hétérodimérique de protéines de la famille Rel (composée des membres p65 ou RelA, p50, c-Rel, RelB et p52). Ces protéines comportent chacune un domaine « Rel homology » assurant non seulement leur dimérisation – l'hétérodimère p65-p50 représente la forme la plus abondante et la mieux caractérisée de NF- κ B – mais aussi leur liaison à l'ADN au niveau des éléments κ B (Matt, 2002). Lorsque le facteur de transcription NF- κ B est transloqué dans le noyau, il se lie à ces éléments et peut ainsi induire la transcription de ses gènes cibles. Etant donné que ce facteur de transcription est requis pour l'activation de la plupart sinon de tous les gènes induits par le LPS dans les monocytes (Guha and Mackman, 2001), nous avons étudié son rôle putatif dans la transcription des miR-132 et -212.

Outre NF- κ B, de nombreux autres facteurs de transcription activés en aval de la voie de signalisation du LPS sont nécessaires à l'induction de l'expression des médiateurs inflammatoires (Guha and Mackman, 2001). Parmi les facteurs de transcription activés en aval des MAPK, ceux appartenant à la famille AP-1 jouent un rôle particulier dans l'inflammation, en régulant, tout comme NF- κ B, l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Cette famille de facteurs de transcription est composée de dimères de protéines Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) et ATF (ATF2, ATF3 et B-ATF) essentiellement, bien que d'autres protéines puissent également s'associer à c-Fos ou c-Jun, comme des protéines de la famille Maf (c-Maf, MafB, MafF, MafG, MafK) et JDP (Jun-dimerizing partners). Lorsque les cellules sont exposées à des stimuli pro-inflammatoires, les kinases p38 et JNK entrent dans le noyau et activent par phosphorylation les facteurs de transcription AP-1 liés à l'ADN. Cette phosphorylation induirait une augmentation de l'affinité d'AP-1 pour son co-activateur CBP, permettant une induction de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 (Matt, 2002).

Par ailleurs, le facteur de transcription CREB, qui est activé par le LPS via la protéine MSK1 en aval des voies ERK1/2 et p38 (Vermeulen et al., 2009) semble également un candidat opportun dans l'étude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212. Ceci est d'autant plus vrai que son rôle dans l'expression de ces miRNAs a été suggéré à plusieurs reprises dans différents contextes (voir point II.2) et validé dans le contexte neuronal (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005). Dès lors, au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait exercer CREB dans la transcription des miR-132 et -212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Objectifs

Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont démontré l'importance du rôle régulateur des miRNAs dans de très nombreux processus physiologiques, dont la prolifération, la survie, la différenciation, le développement, le métabolisme et l'inflammation, pour n'en citer que quelques-uns.

Les miR-132 et miR-212 ont jusqu'à présent été essentiellement étudiés dans des contextes neuronaux chez la souris, contextes dans lesquels quelques rôles physiologiques de leur induction ont pu être proposés suite à l'identification de plusieurs cibles. Bien que ceci n'ait pas encore été démontré chez l'homme, ces deux miRNAs sont transcrits de façon polycistronique chez la souris (Fiedler et al., 2008) et leur expression dépend du facteur de transcription CREB (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005). Néanmoins, aucun autre facteur de transcription régulant l'expression de ces miRNAs n'a encore été validé.

Il a été rapporté il y a quatre ans que le miR-132 était également induit lors de la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (Taganov et al., 2006); néanmoins, les mécanismes responsables de cette induction ainsi que son rôle physiologique n'ont pas encore été abordés dans ce contexte. Très peu d'éléments sont d'ailleurs connus à propos de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire. Il a été démontré que le miR-132, induit lors de la stimulation au LPS de macrophages primaires murins et humains, réprimait l'expression de l'acétylcholinestérase et qu'il pourrait de cette façon jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation (Shaked et al., 2009). Ce miRNA est également induit lors de l'infection virale de cellules endothéliales lymphatiques, dans lesquelles il réprime l'expression du co-activateur transcriptionnel p300. A un niveau plus physiologique, il a aussi été démontré que ce miRNA était surexprimé dans les monocytes et macrophages de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Pauley et al., 2008). Ces études suggèrent toutes un rôle du miR-132 dans les processus inflammatoires ; néanmoins, la question de la régulation transcriptionnelle de ce miRNA n'a pas encore été abordée dans ces contextes.

Au laboratoire, Aurélie Tachenay (thèse en cours, URBC, FUNDP) a mis en évidence que les miR-132 et miR-212 étaient induits par différents stimuli pro-inflammatoires (LPS, IL-1 β , TNF- α) dans les monocytes et macrophages de la lignée THP-1. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle ces miRNAs joueraient un rôle important dans les réponses aux stimuli pro-inflammatoires. L'objectif de ce mémoire consiste en l'étude des mécanismes responsables de l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Dans un premier temps, l'objectif était (i) de caractériser les profils d'expression des miR-132 et miR-212 en réponse à une stimulation au LPS de monocytes et de macrophages afin de déterminer si ces miRNAs présentent des profils d'expression similaires et (ii) de déterminer si ces miRNAs sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme, comme cela a été démontré chez la souris. Dans un second temps, nous souhaitons déterminer si l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS résultait de processus transcriptionnels. Ensuite, dans un troisième temps, nous avons voulu tester le rôle potentiel de facteurs de transcription qui, *a priori*, pourraient participer à la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans ce contexte. Dans le but d'étudier plus en détails la région promotrice des miR-132 et miR-212, nous voulions également construire un plasmide rapporteur sous le contrôle d'une région promotrice putative de ces miRNAs. Enfin, dans un quatrième temps, nous désirions étudier l'expression de deux cibles rapportées du miR-132, SirT1 et p300, étant donné que ces cibles pourraient participer à des boucles de rétro-régulation de l'expression de ces miRNAs.

Matériel et méthodes

Milieux	RPMI base	RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine 2 mM (Invitrogen, Gibco)
		Sodium pyruvate 1 mM (Invitrogen, Gibco)
		HEPES 10 mM (Invitrogen, Gibco)
		Glucose 2,5 g/l
		2-β-mercaptoéthanol 0,05 mM (Invitrogen, Gibco)
	RPMI complet	RPMI base
		HIS (sérum de veau foetal inactivé à la chaleur) 10% (Invitrogen, Gibco)
Boîtes de culture de 25, 50 ou 75 cm ² (T25, T75 et T150, Costar, Corning)		
Compteur de cellules (Countess TM automated cell counter, Invitrogen)		
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf)		

Table 2.1 : Matériel requis pour la culture cellulaire.

Molécules – Société et numéro de référence	Fonction	Concentration stock	Concentration finale	Durée de (pré-) incubation
PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) - Sigma P-8139	Analogue du diacylglycérol. Provoque la différenciation des monocytes en macrophages	0,5 µg/µl dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) (ou 810 µM)	0,02 µg/ml (32,4 nM)	24h
LPS (lipopolysaccharide) d' <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 - Sigma L-2630	Composant de la paroi d' <i>E.coli</i> . Active plusieurs voies de signalisation, notamment par sa liaison au TLR-4 (voir Introduction, point III)	2 mg/ml dans de l'H ₂ O	1 µg/ml	Variable
SP 600125 - Tocris Bioscience 1496	Inhibiteur de JNK	20 mM dans du DMSO	10 µM, 20 µM ou 30 µM	Pré-incubation 30 min avant la stimulation au LPS
Ro-31-8220 - Calbiochem #557520	Inhibiteur de MSK1	50 mM dans du DMSO	5 µM	Pré-incubation 1h avant la stimulation au LPS
H-89. 2HCl - BioMol EI-296	Inhibiteur de PKA	20 mM dans du DMSO	20 µM	Pré-incubation 1h avant la stimulation au LPS
Actinomycine D de <i>Streptomyces sp.</i> - Sigma A 1410	Inhibiteur de la transcription	5 mg/ml dans de l'éthanol	5µg/ml	Pré-incubation 30 min avant la stimulation au LPS

Table 2.2 : Molécules et inhibiteurs utilisés pour la différenciation et la stimulation des cellules.

I. Culture et traitement des cellules THP-1

I.1. Description de la lignée THP-1

Les cellules de la lignée monocyttaire humaine THP-1 ont été isolées par Tsuchiya *et al.* (Tsuchiya et al., 1980) chez un garçon atteint d'une leucémie aigüe monocyttaire. Ces cellules présentent des caractéristiques très proches des cellules monocytaires primaires humaines et peuvent être différenciées en cellules macrophagiques suite à une stimulation au PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) (Auwerx, 1991).

I.2. Culture cellulaire

Les cellules THP-1 (American Type Culture Collection, TIB-202TM) sont passées tous les deux à trois jours dans du RPMI complet (voir table 2.1) stérile et préchauffé à 37°C. Lors des passages, la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 1000 RPM (rotations par minute) et le culot cellulaire est resuspendu dans du RPMI complet à une densité de 2.10^5 cellules/ml. Ces cellules sont ensemencées dans des nouvelles boîtes de culture (15 ml par T75 ou 30 à 50 ml par T150) et maintenues dans un incubateur à atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et thermostatisé à 37°C.

I.3. Stimulation cellulaire

Les molécules utilisées lors de la différenciation et la stimulation des cellules ainsi que leurs concentrations sont indiquées à la table 2.2. La figure 2.1 illustre la chronologie des manipulations lors des stimulations cellulaires.

I.3.a. Différenciation au PMA

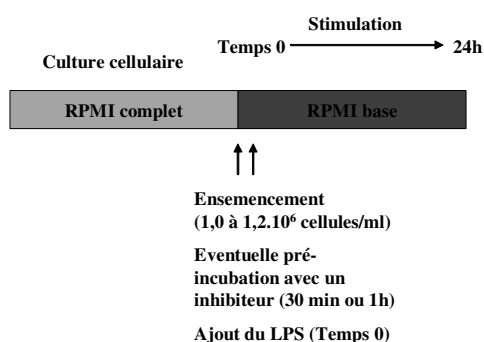
Les monocytes à différencier sont resuspendus à une densité comprise entre 1.10^6 et $1,2.10^6$ cellules/ml (excepté lorsque d'autres densités cellulaires sont spécifiquement indiquées, pour les optimisations de transfections de siRNA et de plasmides) dans du RPMI complet contenant 0,02 µg/ml de PMA. Après 24h, le milieu de différenciation est décanté et le tapis cellulaire lavé délicatement deux fois au tampon phosphate (PBS, phosphate buffer saline). Les cellules sont ensuite mises au repos dans du milieu complet pendant encore 24h avant leur stimulation au LPS. Les volumes de milieu de culture ou de rinçage sont de 3 ml/T25 et 9 ml/T75 pour les manipulations de différenciation et de stimulation.

I.3.b. Stimulation au LPS

Stimulation des cellules en suspension (monocytes)

Les suspensions de monocytes à stimuler sont centrifugées 5 min à 1000 RPM. Le culot cellulaire est resuspendu à une densité comprise entre 1.10^6 et $1,2.10^6$ cellules/ml dans du

Monocytes



Macrophages

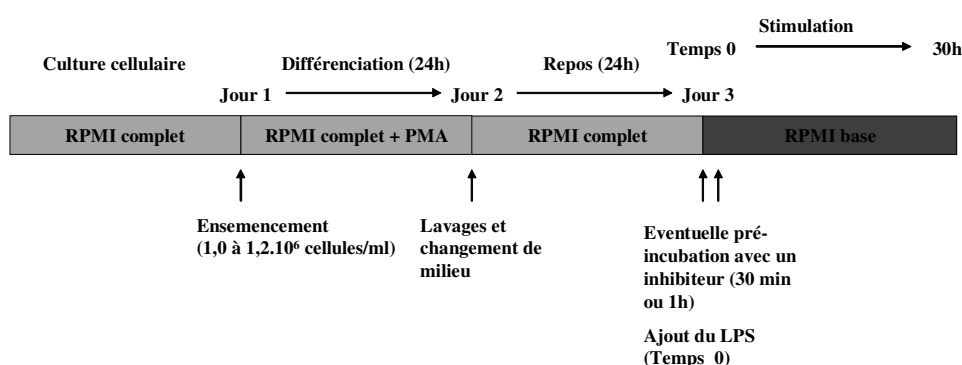


Figure 2.1 : Chronologie des manipulations réalisées lors des stimulations cellulaires (monocytes et macrophages).

Agents de transfection	Lipofectamine TM 2000 Reagent (Invitrogen)
	Oligofectamine TM Reagent (Invitrogen)
	HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen)
	DharmaFECT (Thermo Scientific Dharmacon®)
Milieux	OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco)
	RPMI base (voir table 2.1)
	RPMI complet (voir table 2.1)
Indicateur de transfection	siGLO® Transfection Indicators (Thermo Scientific Dharmacon®)
siRNA	ON-TARGETplus® SMARTpool human RelA (Thermo Scientific Dharmacon®) (« sip65 »)
	ON-TARGETplus® SMARTpool human CREB1 (Thermo Scientific Dharmacon®) (« siCREB »)
	ON-TARGETplus® Control Pool Non-targeting pool (Thermo Scientific Dharmacon®) (« siNT »)
Plaques de culture 24 puits (Costar, Corning)	
T25 (Costar, Corning)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf)	

Table 2.3 : Matériel utilisé lors des mises au point de transfection de siRNA.

RPMI base (sans sérum) contenant 1 µg/ml de LPS ou dans du RPMI base seul pour les cellules contrôles. Les cellules sont transférées dans des boîtes de culture et placées à l'étuve pour une durée variable (voir Résultats et discussion).

Stimulation des cellules adhérentes (macrophages)

Après les 24h de repos consécutives à l'étape de différenciation au PMA, le milieu des cellules est décanté et remplacé par du RPMI base contenant 1 µg/ml de LPS ou par du RPMI base seul pour les cellules contrôles.

I.3.c. Pré-incubation en présence de différents inhibiteurs

Dans certaines expériences, les cellules ont été incubées (ou non) en présence de différents inhibiteurs (SP 600125, Ro-31-8220, H-89, actinomycine D, voir table 2.2). Dans ce cas, les molécules inhibitrices ont été ajoutées 24h après la mise au repos des macrophages dans le milieu de culture RPMI base 30 min ou 1h avant l'ajout (ou non) de LPS (à une concentration finale de 1 µg/ml), à l'exception de l'actinomycine D, qui a été ajoutée dans du RPMI base lors de la resuspension de monocytes après une centrifugation de 5 min à 1000 RPM.

I.4. Transfection de siRNA dans les THP-1

I.4.a. Principe

La transfection de siRNA est une technique employée en vue de réprimer de façon spécifique l'expression d'une protéine. Cette technique est basée sur le mécanisme naturel de silençage de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel dépendant des ARN interférants. Elle consiste en l'introduction dans les cellules de siRNA produits artificiellement qui dirigent les complexes RISC cellulaires vers les ARNm des protéines dont on veut spécifiquement réprimer l'expression. Etant donné la complémentarité parfaite existant entre les siRNA et leurs ARNm cibles, les siRNA induisent le clivage de leur cible et répriment de cette façon leur expression.

I.4.b. Optimisations de transfection de siRNA

Les optimisations de transfection de siRNA ont été réalisées en utilisant des indicateurs de transfection fluorescents (siGLO®) ainsi les agents de transfection indiqués à la table 2.3. Les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées en conditions stériles et RNase-free.

Transfection de cellules adhérentes (macrophages)

Au jour 1, un certain nombre de cellules (indiqué à la table 2.4) ont été différenciées au PMA dans un volume de 500 µl dans le puits d'une plaque 24 puits. Au jour 2, ces cellules ont soit été mises au repos jusqu'au jour 3 (cas des transfections simples avec la Lipofectamine 2000, l'Oligofectamine et le DharmaFECT) soit été transfectées directement après le retrait du PMA (cas des transfections doubles et transfection à l'HiPerFect). Les transfections ont été réalisées dans les conditions résumées à la table 2.4, en suivant les protocoles fournis par les

Agent de transfection	Dilutions testées	[siGLO] finale	Mélange de transfection		Transfection avant ou après différenciation	Nombre de transfections	Nombre de cellules par puits	Taux de transfection estimé
			Agent transfectant	siGLO® Transfection Indicators 20 µM				
Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen)	1000X	30 nM	0,5 µl + 49,5 µl d'OPTI-MEM® I	0,75 µl + 49,25 µl d'OPTI-MEM® I	Après	1	100 000 et 200 000	Faible (< 30%)
	500X	30 nM et 50 nM	1 µl + 49 µl d'OPTI-MEM® I	0,75 µl + 49,25 µl d'OPTI-MEM® I (30nM) ou 1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I (50nM)	Après	1	100 000 et 200 000	~ 30%
	400X	50 nM	1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I	1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I	Avant et après	1	200 000	~ 40% après différenciation ; indéterminable avant différenciation
	333X	50 nM	1,5 µl + 48,5 µl d'OPTI-MEM® I	1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I	Avant	1	200 000	Indéterminable
	286X	50 nM	1,75 µl + 48,25 µl d'OPTI-MEM® I	1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I	Après	1 ou 2	200 000	~ 60% (1 seule transfection) ~65% (2 transfections)
Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen)	159X	50 nM	3 µl + 12 µl d'OPTI-MEM® I	1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I	Après	1	100 000 et 200 000	~ 75% (1 seule transfection) ~ 90% (2 transfections)
	26X	50 nM	6 µl d'HiPerFect + 0,375 µl de siGLO + 50 µl de RPMI base	Après	1	1	200 000	Toxicité trop élevée
	34X	50 nM	6 µl d'HiPerFect + 0,5 µl de siGLO + 100 µl de RPMI base	Après	1	1	20 000 et 200 000	Toxicité trop élevée
	500X	30 nM	1 µl + 49 µl d'OPTI-MEM® I	0,75 µl + 49,25 µl d'OPTI-MEM® I	Après	1	100 000 et 200 000	Faible (< 30%)

Table 2.4 : Agents de transfection, conditions de transfection testées et taux de transfection estimés lors des mises au point de transfection de siRNA en plaque 24 puits.

fabriquants. Le jour suivant la transfection (ou la seconde transfection dans le cas des transfections successives), l'efficacité de transfection a été estimée en calculant le rapport entre le nombre de cellules transfectées, apparaissant vertes au microscope à fluorescence grâce aux siGLO® et le nombre de cellules total, dénombrées au microscope à fond clair. Les résultats (table 2.4) indiquent que le protocole le plus efficace consiste en deux transfections successives de cellules préalablement différenciées en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X. L'efficacité de la Lipofectamine 2000 étant supérieure à celle des autres agents utilisés, seul cet agent de transfection a été testé pour la transfection de monocytes.

Transfection de cellules en suspension (monocytes)

Au jour 1, les cellules ont étéensemencées dans les puits d'une plaque 24 puits à raison de 200 000 cellules/400 µl de RPMI complet/puits. Au jour 2, les cellules ont été transfectées dans les conditions résumées à la table 2.4 (transfection avant différenciation). Les cellules ont ensuite été différenciées par l'ajout de PMA soit 4h après la transfection, soit le lendemain. L'efficacité de la transfection a été évaluée 24h après l'ajout de PMA mais suite à la différenciation des cellules en amas, les taux de transfection n'ont pas pu être calculés.

I.4.c. Transfection de sip65 et siCREB

Afin de réprimer l'expression du facteur de transcription CREB et de la sous-unité p65 (ou RelA) du facteur NF-κB, des siRNA spécifiquement dirigés contre CREB (« siCREB ») et/ou contre p65 (« sip65 ») ont été transfectés dans des macrophages le jour suivant l'addition de PMA ainsi que deux jours plus tard (voir chronologie des manipulations à la figure 2.2). Des siRNA « non-target » (« siNT ») ont été utilisés comme contrôle en appliquant les mêmes conditions de transfection. Lors de ces transfections, les cellules ont été incubées pendant 4h en présence des complexes siRNA (concentrations indiquées dans la partie « Résultats et discussion ») – Lipofectamine 2000 (diluée 286X au final) avant d'être mises au repos dans du RPMI complet pendant 20h. Initialement (lors des mises au point de transfection de sip65 et de siCREB), 400 µl de complexes étaient utilisés pour transfecter 4.10^6 cellules se trouvant dans 1,6 ml de RPMI complet dans des T25. Cependant, ces conditions ne permettant pas d'obtenir un taux de transfection comparable à celui obtenu lors des optimisations en plaques 24 puits, lors des manipulations suivantes (transfection de siRNA suivie d'une stimulation au LPS des cellules et de l'étude de l'expression des miRNAs) les conditions de transfection ont été ajustées de façon à se rapprocher des proportions (nombre de cellules/volume de transfection) utilisées lors des mises au point, tout en étant acceptables techniquement à plus grande échelle. Dès lors, 600 µl de complexes ont été utilisés pour transfecter 2.10^6 cellules se trouvant dans 2,4 ml de RPMI complet dans des T25.

II. Extractions protéiques et Western Blots

II.1. Extractions et dosages protéiques

Une fois le temps de stimulation au LPS écoulé, les boîtes de culture sont placées sur glace et les cellules sont rincées 2 fois au PBS froid. Pour cela, les monocytes sont raclés délicatement dans leur milieu (ceci permet de décrocher les monocytes rendus adhérents par la stimulation au LPS) puis centrifugés pendant 5 min à 300 g. Le culot de cellules est rincé 2 fois en

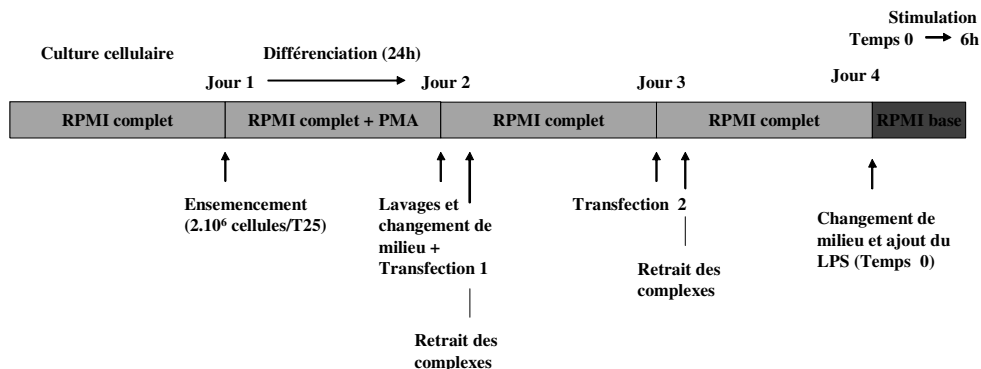


Figure 2.2 : Chronologie des manipulations réalisées lors de la transfection de siRNA suivie de la stimulation au LPS des macrophages.

Tampon	Composition
Tampon 10% Triton	10% Triton X-100
	0,16% de PIC (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche)
	PIB dilué 25X (Phosphatase Inhibitor Buffer, le stock concentré 25 X est composé de Na ₃ VO ₄ 25 mM, 4-nitrophenylphosphate 250 mM, β-glycerophosphate 250 mM et de NaF 125 mM)
	Tris pH 7,4 20 mM
	KCl 150 mM
	EDTA 2 mM
Tampon DLA	urée 7 M
	thiourée 2 M
	CHAPS 4%
	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 30 mM
	DTT 60 mM
	PIC 0,16% (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche)
	PIB dilué 25X
PBS pH 7,4	NaCl 150 mM
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM

Table 2.5 : Composition des tampons de lyse utilisés pour les extractions protéiques totales et nucléaires.

Gels tris-glycine	Gel de séparation 12%	Pour deux mini-gels de 1,5 mm d'épaisseur : <ul style="list-style-type: none"> - 7,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 ; SDS 0,4% - 12 ml d'acrylamide 30% ; Bis 0,8% (Bio-Rad) - 9 ml d'H₂O - 30 µl de Temed - 1,5 ml d'ammonium persulfate 1%
	Gel d'empilement 3%	Pour deux mini-gels de 1,5 mm d'épaisseur : <ul style="list-style-type: none"> - 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,4% - 1 ml d'acrylamide 30% ; Bis 0,8% (Bio-Rad) - 5,5 ml d'H₂O - 10 µl de Temed - 1 ml d'ammonium persulfate 1%
Tampons	Tampon d'électrophorèse (pH compris entre 8,5 et 8,9)	Pour 1l : <ul style="list-style-type: none"> - 3,028 g de Tris-HCl (= 25 mM) - 14,4 g de glycine (= 192 mM) - 10 ml de SDS 10% (= 1% final)
	Tampon de transfert (pH porté à 8,3 avant l'ajout de méthanol)	Pour 1l : <ul style="list-style-type: none"> - 2,43 g de Tris-HCl (= 10 mM) - 10,9 g de glycine (= 145 mM) - 200 ml de méthanol
Etalon de poids moléculaire : See Blue plus 2 Prestained Standard (Invitrogen)		
Membrane Immobilon™ (Millipore)		
Méthanol 100% (Acros)		
Papiers Whatman (Merck)		

Table 2.6 : Matériel requis pour les électrophorèses en gels tris-glycine et le transfert des protéines sur membranes.

présence d'1 ml de PBS froid avant d'être resuspendu dans du tampon de lyse (composition des tampons de lyse utilisés à la table 2.5). Pour les macrophages, les lavages sont réalisés soit de la même façon que pour les monocytes (lorsque le traitement induit le détachement des cellules (H-89)), soit le tapis cellulaire est rincé une fois au PBS, puis les cellules raclées dans du PBS et centrifugées 5 min à 300 g avant d'être lysées, soit le tapis cellulaire est rincé deux fois au PBS froid puis les cellules raclées directement dans le tampon de lyse.

Les extraits protéiques utilisés pour le premier Western Blot SirT1 (figure 3.20a de la partie Résultats et discussion) ont été obtenus en lysant les macrophages dans 250 µl de tampon de lyse Triton 10%/T25. Les lysats ont été transférés en tubes, agités sur roue pendant 15 min à 4°C, centrifugés pendant 15 min à 13 000 RPM à 4°C et le surnageant contenant les protéines a été récolté. Etant donné que cette extraction ne permettait pas d'obtenir des échantillons suffisamment concentrés, les autres extractions protéiques ont été réalisées en utilisant le tampon de lyse DLA. Selon la densité cellulaire, 50 à 100 µl de ce tampon sont utilisés pour lyser une T25 de cellules. Les lysats obtenus de cette façon sont agités pendant 30 min minimum à 4°C avant que les surnageants contenant les protéines ne puissent être récoltés suite à une centrifugation de 10 min à 13 000 RPM et 4°C.

Les concentrations protéiques des échantillons sont déterminées en utilisant le réactif de Pierce selon les recommandations indiquées par le fabricant.

II.2. Western Blots

II.2.a. Principe

Le Western Blot est une technique permettant de déterminer de façon semi-quantitative l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un échantillon protéique complexe. Cette technique repose sur la séparation électrophorétique en gel d'acrylamide des protéines selon leur poids moléculaire, leur transfert sur une membrane ainsi que le marquage spécifique de la protéine d'intérêt par des anticorps primaires et secondaires. Dans le cas de la révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR), les anticorps secondaires sont couplés à des sondes émettant dans l'infrarouge et l'abondance de la protéine d'intérêt est évaluée en scannant la membrane avec un scanner détectant ces ondes infrarouges. Dans le cas de la révélation en ECL (enhanced chemiluminescence), les anticorps secondaires sont couplés à des enzymes « horseradish peroxidase » (HRP). Ces enzymes émettent de la lumière en catalysant l'oxydation de leur substrat. La chémluminescence émise par ces enzymes peut être détectée par une caméra suite à l'addition, dans la solution de révélation, de composés chimiques permettant une amplification de la lumière émise.

II.2.b. Méthode

Electrophorèse en gel tris-glycine et transfert sur membrane (table 2.6)

Pour réaliser les Western Blots p65, CREB et phospho-CREB, des quantités identiques de protéines (20 µg pour la révélation de p65 et de CREB lors des manipulations de transfection de siRNA et 30 µg pour la révélation de phospho-CREB et de CREB total lors des manipulations en présence des inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220) sont additionnées de tampon

Tampon de charge	NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen)
DTT	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,4%	
Gel NuPAGE® 3-8% Tris-Acétate (Invitrogen)	
Tampon de migration	Novex® Tris-Acétate SDS Running Buffer (Invitrogen) NuPAGE® Antioxydant (Invitrogen) 0,625% au final
Cuve d'électrophorèse : Novex minigel-cell (Invitrogen)	
Etalon de poids moléculaire : High Molecular Weight Protein Standard (Invitrogen)	
Tampon de transfert	NuPAGE® Transfert Buffer (Invitrogen) NuPAGE® Antioxydant (Invitrogen) 1% Méthanol 10% Pour le Western blot p300 : 0,05% SDS
Membrane Immobilon™ (Millipore) ou Hybond™-P (Amersham, GE Healthcare) (pour p300)	
Méthanol 100%	
Papier Whatman (Merck)	

Table 2.7 : Matériel requis pour les électrophorèses en gels NuPAGE® et le transfert des protéines sur membranes.

Révélation LI-COR	Révélation ECL
Boîtes LI-COR	Boîtes LI-COR
Agitateur (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)	Agitateur (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)
Agent bloquant Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR)	ECL Advance™ Blocking Reagent (Amersham, GE Healthcare)
Anticorps (voir table 2.9)	Anticorps (voir table 2.9)
PBS (NaCl 150 mM ; KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM ; pH 7,4)	TBS (Tris 20 mM ; NaCl 133 mM ; pH 7,6)
Tween®-20 (Merck)	Tween®-20 (Merck)
Scanner infrarouge Odyssey® Infrared Imaging System (Westburg)	Solution de révélation: Lumigen™ TMA-6 (solutions A et B mélangées en proportions identiques GE Healthcare)
Logiciel Odyssey V3.0 (Westburg)	ImageQuant™ 350 (GE Healthcare)

Table 2.8 : Matériel requis pour la révélation des Western Blots en LI-COR et en ECL.

Révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR)				
Protéine	Anticorps primaires	Dilution	Anticorps secondaires	Dilution
p65	IgG de lapin anti-NF-κB p65 (Santa Cruz SC-372)	5 000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926-32211)	10 000 X
CREB (1)	IgG de lapin anti-CREB (Cell Signaling Technology # 9197)	500 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926-32211)	8 000 X
CREB (2)	IgG de lapin anti-CREB (Cell Signaling Technology # 4820)	4 000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926-32211)	10 000 X
Phospho-CREB (Ser133)	IgG de lapin anti-phospho-CREB (Ser133) (Upstate # 06-519)	1 000 X ou 2 000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926-32211)	10 000 X
SirT1	IgG de lapin anti-SirT1 (Cell Signaling Technology #2496S)	1 500 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926-32211)	10 000 X
α-Tubuline	IgG de souris anti-α-tubuline (Sigma T5168)	10 000 X	IgG de chèvre anti-IgG de souris-IR Dye® 680 (LI-COR LI 926-32220)	10 000 X
Révélation en ECL				
Protéine étudiée	Anticorps primaires	Facteur de dilution	Anticorps secondaires	Facteur de dilution
p300	IgG de souris anti-p300 (Novus Biologicals NB100-617)	10 000 X	IgG de mouton anti-IgG de souris-HRP (Amersham GE Healthcare #NA931V)	200 000 X
α-Tubuline	IgG de souris anti-α-tubuline (Sigma T5168)	50 000 X	IgG de mouton anti-IgG de souris-HRP (Amersham GE Healthcare #NA931V)	100 000 X

Table 2.9 : Anticorps utilisés pour la révélation des Western Blots.

de charge 5X et portées à un volume final identique par l'ajout de Tris 0,5 M, pH 6,8. Ces échantillons sont incubés 5 min à 100°C puis centrifugés 5 min à 13 000 RPM avant d'être déposés sur des mini-gels tris-glycine (table 2.6). La migration est effectuée durant 1h à 1h15 à 200 V. Pour réaliser le transfert, des membranes de la taille du gel sont pré-traitées 1 min au méthanol 100% (hydratation des membranes) puis rincées dans du tampon de transfert (table 2.6). Des papiers Whatman épais sont également humidifiés dans ce tampon de transfert. Le montage suivant est réalisé: papier Whatman – membrane – gel – papier Whatman. Cet empilement est déposé sur un blotter et le transfert est effectué pendant 2h15 à environ 60 mA par gel (1 mA par cm² de membrane) ou une nuit à 30 mA. La suite de la révélation est commune aux Western Blots réalisés à partir d'électrophorèses en gels NuPAGE.

Electrophorèse en gel NuPAGE® et transfert sur membrane (table 2.7)

Les protéines SirT1 et p300 étant de haut poids moléculaire (respectivement 120 et 300 kDa), les Western Blots permettant d'évaluer leur abondance ont été réalisés à partir d'électrophorèses en gels précoulés NuPAGE® Tris-Acétate comportant un gradient d'acrylamide de 3 à 8%. Une quantité identique de protéines pour chaque échantillon (entre 15 et 40 µg pour l'étude de l'abondance de SirT1 ; 50 µg pour l'étude de l'abondance de p300) est additionnée de tampon de charge 4X concentré, de DTT 0,05 M final et portée à un volume identique par l'ajout de Tris 0,5 M, pH 6,8. Ces échantillons sont incubés à 70°C pendant 10 min puis centrifugés pendant 5 min à 13 000 RPM. Le gel précoulé est placé dans la cuve, les tampons et le montage sont réalisés en suivant les recommandations et les échantillons sont déposés dans les puits du gel. La migration est effectuée pendant 45 min à 200 V. Le transfert est effectué tel que décrit au point précédent, à l'exception du tampon de transfert dont la composition est indiquée à la table 2.7.

Blocage de la membrane et révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR)

Une fois le transfert terminé, les membranes sont transférées dans des boîtes et incubées en présence d'agent bloquant dilué 2X dans du PBS pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C en présence d'une faible agitation (table 2.8). Cette étape permet de limiter la fixation non spécifique ultérieure d'anticorps. Les anticorps primaires dirigés contre les protéines à révéler sont dilués (table 2.9) dans de l'agent bloquant contenant 0,1% de Tween et les membranes sont incubées avec ces anticorps pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées 4 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1% de Tween, puis incubées pendant 1h avec les anticorps secondaires, également dilués dans de l'agent bloquant contenant 0,1% de Tween. Les membranes sont à nouveau lavées 4 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1% de Tween puis 2 fois avec du PBS sans Tween. Elles sont ensuite séchées à l'obscurité, puis scannées et quantifiées à l'aide du scanner infrarouge et du logiciel Odyssey. Ces membranes sont ensuite conservées à l'abri de la lumière à température ambiante pour une éventuelle nouvelle révélation. Lorsqu'une nouvelle protéine doit être détectée sur une membrane, celle-ci est ré-hydratée 1 min dans du méthanol, rincée au PBS puis bloquée et révélée selon le protocole décrit.

Blocage de la membrane et révélation en ECL (pour l'étude de p300)

Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation (types d'extraction protéique ; conditions de transfert et de blocage ; types et dilutions des anticorps), nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence p300 par le système de révélation LI-COR. Le Western-blot présenté à la figure 3.21 a donc été révélé en ECL. Lors de ce type de révélation, les membranes sont, après

PBS pH 7,4	NaCl 150 mM
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM
Tampon HB 1X	Hepes 20 mM
	NaF 5 mM
	Na ₂ MoO ₄ 1 mM
	EDTA 0,1 mM
Tampon de lyse NP-40 0,5% pour extraction nucléaire saline	Hepes 20 mM
	NaF 5 mM
	Na ₂ MoO ₄ 1 mM
	EDTA 0,1 mM
	NP-40 0,5%
Solution de resuspension (RE)	Hepes 20 mM
	NaF 5 mM
	Na ₂ MoO ₄ 1 mM
	EDTA 0,1 mM
	Glycérol 17,4%
Solution saline (SA)	Hepes 20 mM
	NaF 5 mM
	Na ₂ MoO ₄ 1 mM
	EDTA 0,1 mM
	Glycérol 17,4%
	NaCl 800 mM
PIC (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche) 25X concentré	
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) 25X concentré	Na ₃ VO ₄ 25 mM
	4-nitrophenylphosphate 250 mM
	β-glycerophosphate 250 mM
	NaF 125 mM

Table 2.10 : Solutions utilisées pour l'extraction saline de protéines nucléaires.

transfert, bloquées pendant 1h à température ambiante dans du TBS (tris-buffer saline) contenant 0,1% de Tween et 2% de ECL *Advance*TM Blocking Reagent (table 2.8). Elles sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C en présence des anticorps primaires (dilués dans du TBS + 0,1% Tween + 2% d'agent bloquant), lavées 3 fois 15 min avec du TBS + 0,1% Tween, puis incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires (également dilués dans du TBS + 0,1% Tween + 2% d'agent bloquant) et à nouveau lavées 3 fois 15 min. Ensuite, 500 µl de solution de révélation sont étalés sur les membranes et après 2 min d'incubation, la chimioluminescence émise par les enzymes couplées aux anticorps secondaires est observée à l'aide d'une caméra (ImageQuantTM 350 (GE Healthcare)).

III. Extractions protéiques nucléaires et tests de liaison à l'ADN de facteurs de transcription

III.1. Extractions protéiques nucléaires

III.1.a. Principe

Le protocole utilisé est modifié d'après le protocole de purification de noyaux décrit par (Dignam et al., 1983) et le protocole d'extraction saline décrit par (Chen et al., 1996). L'extraction nucléaire saline repose sur l'emploi d'un tampon hypotonique induisant le gonflement des cellules et donc la fragilisation de leur membrane externe. Les membranes plasmiques sont ensuite lysées à l'aide d'un détergent doux, tandis que les noyaux sont conservés. Ces derniers sont incubés en présence d'un tampon salin qui déstabilise les interactions ioniques entre les protéines et l'ADN et permet donc leur extraction.

III.1.b. Méthode

Les boîtes de culture sont placées sur glace et les cellules rincées deux fois délicatement au PBS froid (3 ml/lavage), puis incubées pendant 3 min précisément dans 3 ml de tampon HB (hypotonique) (table 2.10). Les boîtes sont décantées et les cellules raclées dans 200 µl de tampon de lyse contenant 0,5% de NP-40. Le lysat est collecté et centrifugé 30 sec à 13 000 RPM. Les surnageants (matériel cytosolique) sont éliminés, tandis que les culots (noyaux) sont resuspendus dans 30 µl de tampon RE additionné de PIC et de PIB. Le volume (RE + culot resuspendu) est évalué et un volume identique de tampon SA additionné de PIC et de PIB est ajouté. Les lysats sont agités sur roue à 4°C pendant 30 min minimum, puis centrifugés 10 min à 13 000 RPM à 4°C. Les surnageants sont récoltés et conservés à -70°C.

III.2. Test de liaison à l'ADN (TransAM)

III.2.a. Principe

Le test de liaison à l'ADN TransAM permet de mesurer la capacité d'un facteur de transcription à se lier sa séquence nucléotidique consensus. Brièvement, des sondes

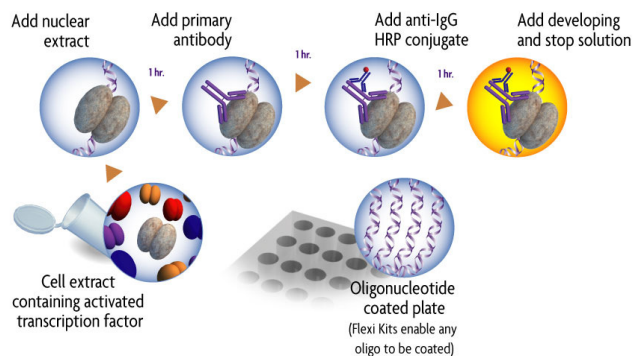


Figure 2.3 : Principe du test de liaison à l'ADN basé sur l'ELISA (TransAM™, Active Motif) (<http://www.activemotif.com>).

Plaques 96 puits tapissées d'oligonucléotides contenant des sites consensus pour le facteur de transcription AP-1 (ces plaques ont été préalablement confectionnées par Aurélie Tacheny)	
Tampon de liaison AP-1	HEPES 2 mM pH 7,9
	EDTA 0,2 mM
	NaCl 8 mM
	Glycérol 12%
	DTT 1 mM
	polydIC 0,165 ng/μl
	Gloria 1%
PBS 50 Tween 0,1% pH 7,4	NaCl 50 mM
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM
	Tween®-20 0,1%
Anticorps primaires et secondaires listés à la table 2.12 et dilués dans du PBS 50 (sans Tween) contenant 1% de BSA	
Tétraméthylbenzidine (TMB, Tebu-bio Laboratories #TMB100-0100)	
HCl 1N	
Spectrophotomètre xMark™ Microplate Spectrophotometer (BioRad) et logiciel Microplate Manager 6 (MPM6)	

Table 2.11 : Matériel utilisé pour les tests de liaison à l'ADN.

Membre étudié	Anticorps primaires	Dilution (dans du PBS 50 + 1% BSA)	Anticorps secondaires conjugués couplés à la HRP	Dilution (dans du PBS 50 + 1% BSA)
c-Jun	IgG de lapin anti-c-Jun (Santa Cruz SC-1694)	1000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054)	1000 X
Phospho-c-Jun	IgG de souris anti-phospho-c-Jun (Santa Cruz SC-822)	1000 X	IgG de chèvre anti-IgG de souris-HRP (Santa Cruz SC-2005)	1000 X
c-Fos	IgG de lapin anti-c-Fos (Santa Cruz SC-7202)	1000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054)	1000 X
JunD	IgG de lapin anti-JunD (Active Motif #100678)	1000 X	IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054)	1000 X

Table 2.12 : Anticorps utilisés pour les tests de liaison à l'ADN des différents membres de la famille AP-1 (ELISA-like).

miRNeasy® MiniKit (Qiagen)	QIAzol lysis reagent
	Colonnes de purification de l'ARN
	Solution RWT additionnée d'éthanol
	Solution RPE additionnée d'éthanol
	H ₂ O RNase-free
Tubes d'1,5 ml DNA Lo-Bind® (Eppendorf)	
PBS RNase-free froid initialement stérile pour éviter une contamination par des RNases (Lonza)	
Chloroforme 100% RNase-free	
Ethanol 100% RNase-free	
Centrifugeuse (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)	

Table 2.13: Matériel requis pour l'extraction d'ARN avec le miRNeasy® MiniKit (Qiagen).

nucléotidiques comportant des sites consensus pour un facteur de transcription d'intérêt sont immobilisées dans des puits dans lesquels sont déposés des extraits nucléaires. Les facteurs de transcription venant se lier à ces sites consensus sont révélés selon le même principe que l'ELISA, avec des anticorps primaires et secondaires couplés à la peroxydase (voir figure 2.3). Au cours de ce mémoire, ce test a été réalisé afin d'évaluer les effets de l'inhibiteur SP 600125 sur la capacité du facteur de transcription AP-1 à lier sa séquence consensus.

III.2.b. Méthode

Cinq µg de protéines nucléaires sont déposées dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés d'oligonucléotides contenant des sites consensus pour le facteur de transcription AP-1 en présence de 30 µl de tampon de liaison (table 2.11) et incubés pendant 1h à température ambiante sous faible agitation. Les puits sont ensuite lavés 3X avec 200 µl de PBS 50 + 0,1% Tween puis incubés pendant 1h à température ambiante sans agitation avec les anticorps primaires adéquats (table 2.12) (100 µl/puits). Après trois nouveaux lavages au PBS 50 + 0,1% Tween, les anticorps secondaires sont ajoutés (100 µl/puits) et incubés pendant 1h à température ambiante sans agitation. Les puits sont ensuite lavés 4X au PBS 50 + 0,1% Tween, décantés, puis 100 µl de TMB sont ajoutés et les puits placés à l'obscurité pendant 10 min. La réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout de 100 µl d'HCl 1N et l'activité peroxydase est évaluée par une lecture de l'absorbance à 450 nm ; référence 655 nm.

IV. Analyse de l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que de leur forme primaire

IV.1. Extractions d'ARN

Toutes les manipulations réalisées en vue d'extraire ou à partir d'échantillons d'ARN sont réalisées en conditions « RNase-free ». Selon les applications, trois types d'extraction d'ARN ont été réalisés au cours de ce mémoire.

IV.1.a.Extractions avec le miRNeasy® MiniKit (Qiagen)

Afin d'étudier l'expression des formes matures des miR-132 et miR-212, l'ARN est extrait des cellules THP-1 par l'utilisation du miRNeasy® MiniKit (Qiagen) (voir matériel à la table 2.13). Les cellules sont rincées 1 fois au PBS froid puis lysées dans 700 µl de tampon de lyse QIAzol dans un tube DNA LoBind®. L'ARN est ensuite extrait des lysats en suivant les recommandations d'utilisation du kit miRNeasy, permettant de conserver les petits ARN (un lavage supplémentaire avec la solution RPE est ajouté afin d'améliorer les ratio de l'extraction). La quantité d'ARN récolté est évaluée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science).

IV.1.b.Extractions avec le TRI Reagent Solution (Ambion)

Le TRI Reagent Solution est utilisé dans les manipulations visant à étudier l'expression de la forme primaire des miR-132 et -212 (le matériel utilisé pour ce type d'extraction est indiqué à

TRI Reagent Solution (Ambion)
Tubes d'1,5 ml DNA Lo-Bind® (Eppendorf)
PBS RNase-free froid initialement stérile pour éviter une contamination par des RNases (Lonza)
Chloroforme 100% RNase-free
2-propanol RNase-free
Ethanol 75% RNase-free froid
H ₂ O RNase-free
Centrifugeuse (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)

Table 2.14 : Matériel utilisé pour l'extraction d'ARN avec le TRI Reagent Solution.

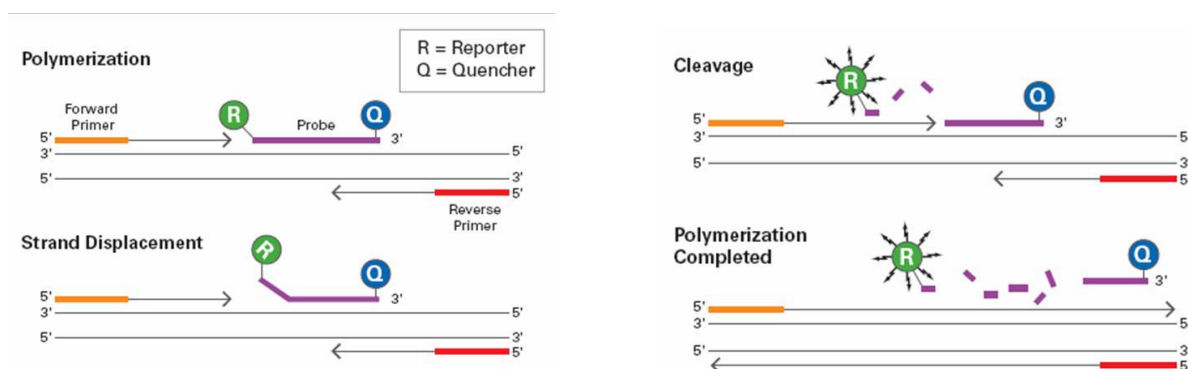


Figure 2.4 : Principe de la méthode Taqman permettant la mesure de l'abondance de transcrits par PCR en temps réel (http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx).

Matériel nécessaire		Volume introduit en µl / réaction de 15 µl
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)	Tampon de réaction 10X concentré	1,5
	H ₂ O RNase-free	4,162
	Inhibiteur de RNases (20 U/µl)	0,188
	Mélange de dNTP (100 mM)	0,15
	Reverse transcriptase (50 U/µl)	1
TaqMan® MicroRNA Assay pour les hsa-miR-132 (#457) ; hsa-miR-212 (#515) ; hsa-miR-155 (#2623) ; RNU-44 (#1094) (Applied Biosystems)	Sondes de rétro-transcription	3
Echantillons d'ARN (miRNeasy® MiniKit) dilués à 20 ng/µl		5

Table 2.15 : Composition des mélanges de rétro-transcription des formes matures des miRNAs.

Matériel	Volume
TaqMan® Universal PCR master mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems)	24 µl
H ₂ O milliQ	18,4 µl
TaqMan® MicroRNA Assay pour les hsa-miR-132 (#457) ; hsa-miR-212 (#515) ; hsa-miR-155 (#2623) ; RNU-44 (#1094) (Applied Biosystems) – sondes pour la PCR en temps réel	2,4 µl
ADNc non dilué (dilution finale : 15X)	3,2 µl

Table 2.16 : Composition des mélanges destinés à la mesure de l'expression relative des miRNAs matures par PCR en temps réel.

la table 2.14). Les cellules sont lavées une fois au PBS froid avant d'être lysées dans 300 µl de TRI Reagent Solution dans un tube DNA LoBind®. Les lysats sont incubés pendant 5 min à température ambiante et la suite de l'extraction est réalisée en suivant le protocole du fabricant. La quantité d'ARN récolté est évaluée au NanoDrop ND-1000.

IV.1.c.Extractions avec le RNeasy® MiniKit (Qiagen)

Lors des essais de rétro-transcription et d'amplification du pri-miR-132/212 par PCR, des extractions d'ARN de monocytes avec le RNeasy® MiniKit (Qiagen) ont été testées en suivant le protocole fourni par le fabricant. Ces essais n'ayant pas abouti à des résultats positifs, ce protocole ne sera pas détaillé.

IV.2. Rétro-transcription et quantification de l'expression des miRNAs matures et du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel

IV.2.a.Principe

La PCR en temps réel est une technique permettant de mesurer l'abondance relative de transcrits au sein des cellules. Cette technique repose tout d'abord sur la rétro-transcription des échantillons d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) puis sur la quantification de l'expression des ADNc, celle-ci étant proportionnelle à l'abondance des ARN d'intérêt. Afin de quantifier l'expression des ADNc, ceux-ci sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Dans le cas de la méthode Taqman (illustrée à la figure 2.4), de petites sondes complémentaires à la séquence de l'ADNc s'hybrident à celui-ci. Ces sondes comportent un fluorochrome et un quencher et n'émettent donc aucun signal fluorescent lorsqu'elles sont intactes. Cependant, lors de l'amplification par PCR des ADNc, ces sondes sont clivées et le fluorochrome est libéré du quencher. L'émission de fluorescence augmente donc à chaque cycle d'amplification PCR. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence distinguable du bruit de fond (Ct ; Cycle threshold) est compté. Plus l'ADNc est abondant au début de la réaction, moins de cycles d'amplification sont requis pour atteindre la valeur seuil de fluorescence.

IV.2.b.Etude des formes matures

Rétro-transcription

La rétro-transcription des formes matures des miRNAs est réalisée dans des microtubes en engageant les réactifs et quantités d'ARN indiqués à la table 2.15. La rétro-transcription est réalisée dans un thermo cycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) en suivant un programme composé de 30 min à 16°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C. Les échantillons sont ensuite refroidis à 4°C avant d'être conservés à -20°C.

PCR en temps réel

L'étude de l'expression relative des miRNAs matures par PCR en temps réel est réalisée en mélangeant les réactifs listés à la table 2.16 puis en répartissant 2 fois 20 µl de ce mélange dans deux puits d'une plaque 96 puits. La réaction est effectuée dans un 7900 HT Fast Real-

TURBO DNA-free™ Kit (Applied Biosystems)	TURBO DNase (2 U /μl)
	Tampon TURBO DNase 10X
	Réactif d'inactivation de la DNase
	H ₂ O nucléase-free
Tubes de 0,5 ml RNase-free (Eppendorf)	
Etuve à 37°C	
Centrifugeuse (Centrifuge 5415 D, Eppendorf)	

Table 2.17 : Matériel utilisé pour le traitement à la DNase des échantillons d'ARN.

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science)	Amorces oligo(dT) ₁₈
	Amorces random hexamer
	H ₂ O PCR grade
	Tampon de réaction de la Transcriptor Reverse transcriptase 5X concentré
	Inhibiteur de RNase
	Mélange de désoxynucléotides (10 mM chacun)
	Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl)
Amorces spécifiques (PrimiR2 AS)	5'-GGG CGA CCA TGG CTG TAG-3' (Eurogentec)
DMSO	
Bétaïne	
Bloc chauffant (DRI-BLOCK® DB-2D, Techne)	

Table 2.18 : Matériel utilisé pour rétro-transcrire le pri-miR-132/212.

Time PCR System (Applied Biosystems) en suivant un programme composé des phases suivantes : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles de 15 sec à 95°C et d'1 min à 60°C. L'expression relative des miRNAs est calculée en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Le ΔC_t est calculé en soustrayant la valeur de C_t moyenne du RNU-44 (utilisé comme contrôle endogène) à la valeur de C_t moyenne du miRNA étudié dans une condition particulière. Le $\Delta\Delta C_t$ est ensuite calculé en soustrayant le ΔC_t de la condition par rapport à laquelle on normalise les résultats (généralement le temps 0h ; voir légendes des graphiques) aux ΔC_t des autres conditions. L'expression relative est enfin donnée par la formule suivante : $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

IV.2.c. Etude du pri-miR-132/212

Traitement à la DNase des extraits d'ARN

Préalablement à leur rétro-transcription, les échantillons d'ARN destinés à l'amplification PCR du pri-miR-132/212 ainsi qu'à la quantification de son expression par PCR en temps réel sont traités à la DNase (voir table 2.17). Pour cela, les échantillons d'ARN sont portés à une concentration maximale de 500 ng/ μ l et mélangés avec 0,1 volume de tampon et la DNase (1,5 μ l pour 35 μ l de réaction). La digestion est effectuée pendant 30 min à 37°C puis est stoppée suite à l'ajout de 0,2 volume de tampon d'inactivation. L'inactivation est réalisée pendant 5 min à température ambiante en vortexant fréquemment les échantillons pour assurer la dispersion du tampon d'inactivation. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1,5 min à 10 000 g, le surnageant est récolté et l'ARN à nouveau dosé au NanoDrop ND-1000.

Rétro-transcription du pri-miR-132/212

Les essais de rétro-transcription du pri-miR-132/212 ont été réalisés en utilisant le matériel indiqué à la table 2.18 et des extraits d'ARN issus des trois méthodes d'extraction décrites précédemment. Brièvement, environ 2 μ g d'ARN sont mélangés avec des amorces (soit random hexamer, soit oligo(dT)₁₈, soit spécifiques), du DMSO (de façon à ce qu'il soit à une concentration finale de 0 à 5% dans les 20 μ l de réaction) et de la bêtaïne (0 à 0,1 M au final) et portés à un volume de 13 μ l (pour une rétro-transcription dans un volume final de 20 μ l). Afin de dénaturer les structures secondaires, différentes durées et températures de dénaturation (65°C pendant 10 min ; 80°C pendant 1, 5 ou 10 min et 95°C pendant 5 min) ont été testées avant la réaction enzymatique. Après dénaturation, les échantillons sont mis sur glace et un mélange contenant le tampon de l'enzyme (équivalent de 4 μ l pour un volume final de réaction de 20 μ l), l'inhibiteur de RNase (0,5 μ l), des désoxynucléotides (2 μ l) ainsi que la transcriptase inverse (0,5 μ l) est ajouté. Différentes durées et températures ont été testées lors des mises au point (protocole classique : 30 min à 55°C ; protocole pour les séquences riches en GC : 30 min à 65°C ou protocole pour les longs transcrits : 1h à 55°C). Au terme des optimisations, il s'est avéré qu'il était possible de rétro-transcrire le pri-miR-132/212 en employant les conditions suivantes : utilisation d'une amorce spécifique à une concentration finale de 2 μ M (pour la démonstration de l'existence d'un pri-miRNA commun aux miR-132 et miR-212) ou d'une amorce poly(dT)₁₈ à une concentration de 2,5 μ M (pour la quantification par PCR en temps réel de l'expression du pri-miRNA), DMSO 1%, bêtaïne 0,1 M, étape de dénaturation de 10 min à 65°C et élongation 30 min à 65°C.

Amplification par PCR du pri-miR-132/212

Matériel utilisé pour l'amplification par PCR du pri-miR-132/212		
Amorces (Eurogentec)	Nom de l'amorce	Séquence
	PrimiR1 Sens	5'-TTG GCT CTA GAC TGC TTA CTG - 3'
	PrimiR1 Antisens	5'-CGA CCA TGG CTG TAG ACT GT -3'
	PrimiR2 Sens	5'-CGG CAC CTT GGC TCT AGA CT - 3'
	PrimiR2 Antisens	5'-GGG CGA CCA TGG CTG TAG -3'
	PrimiR amont Sens	5'-CCT CTG GGA CAT CTT TGA CG - 3'
	PrimiR amont Antisens	5'-CAG TAA GCA GTC TAG AGC CAA -3'
GoTaq Polymerase (5 U/μl) (Promega)		
Tampon Colorless GoTaq TM Reaction Buffer 5X (Promega)		
dNTP Master Mix (20 mM au total) (Eurogentec)		
H ₂ O MilliQ		
DMSO		
Bétaïne 98% (Aldrich)		
Tubes PCR		
Peltier Thermal Cycler PTC-225		
Matériel utilisé pour la visualisation des produits PCR		
Agarose (Ultrapure TM Agarose, Invitrogen)	1,6 g	
Tampon TBE (Tris/borate/EDTA)	80 ml	
Bromure d'éthidium	15 μl	
Tampon de charge (Blue/Orange Loading Dye 6X, Promega)	2 μl dans 10 μl de produits d'amplification	
Etalon BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega)	6 μl/puits	
Cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE		
Générateur de courant (migration 45 min à 110 V)		

Table 2.19: Matériel utilisé lors des essais d'amplification par PCR du pri-miR-132/212.

Restriction par SmaI	
Produits purifiés résultant de l'amplification du pri-miR-132/212 putatif avec les amorces PrimiR2 ou pSKoriTKan linéarisé par EcoRV	8 μl
H ₂ O	9 μl
Tampon J 10X (Promega)	2 μl
Enzyme SmaI (Promega)	1 μl
Restriction par XbaI	
Produits purifiés résultant de l'amplification avec les amorces PrimiR amont	8 μl
H ₂ O	9 μl
Tampon H 10X (Roche)	2 μl
Enzyme XbaI (Roche)	1 μl
Restriction par AatII	
Produits purifiés résultant de l'amplification avec les amorces PrimiR amont	8 μl
H ₂ O	9 μl
Tampon A 10X (Roche)	2 μl
Enzyme AatII (Roche)	1 μl

Table 2.20 : Composition des mélanges de restriction.

Matériel	Volume
TaqMan® Universal PCR master mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems)	24 μl
H ₂ O milliQ	12 μl
TaqMan® Pri-miRNA Assay pour les hsa-miR-132 (Hs 03303111_pri) et hsa-miR-212 (Hs 03302957_pri) et TaqMan® Gene Expression Assay pour la GAPDH (Hs 99999905 m1)(Applied Biosystems) – sondes pour la PCR en temps réel	2,4 μl
ADNc non dilué (dilution finale : 5X)	9,6 μl

Table 2.21 : Matériel utilisé pour la mesure de l'expression relative du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel.

Les essais d'amplification par PCR du pri-miR-132/212 ont été réalisés en utilisant les amorces, solutions et enzymes indiquées à la table 2.19. Les produits de rétro-transcription ont été utilisés comme matrices à des dilutions finales de 10X, 20X ou 50X ; les amorces ont été utilisées à des concentrations finales de 1 μ M, 0,2 ou 0,1 μ M ; les dNTP ont été utilisés à une concentration finale de 200 μ M et l'enzyme à raison de 0,025 U/ μ l de réaction. Différentes concentrations de DMSO et de bétaïne ont également été testées (0 à 10% de DMSO et 0 à 1 M de bétaïne). L'amplification PCR a été réalisée par la succession des programmes suivants : dénaturation initiale de 5 min à 95°C ; 35 cycles comportant 30 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation des amorces (T°C dépendant de la température de fusion (T^m) des amorces) et 15 à 30 sec d'élongation à 72°C (équivalent d'une min d'élongation/kb à amplifier) puis élongation finale pendant 10 min à 72°C. Les produits d'amplification ont ensuite été mélangés à du tampon de charge et visualisés sur un gel d'agarose 2% en présence de bromure d'éthidium (15 μ l/80 ml de gel). La longueur des fragments amplifiés a été estimée grâce à l'étalon.

Purification des produits PCR

Les profils de restriction enzymatique des produits PCR de taille attendue ont été réalisés après purification de ces produits en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) selon le protocole du fabricant. Etant donné la présence de produits aspécifiques lors de l'amplification par PCR réalisée avec les amorces « primiR2 », les produits de taille attendue ont d'abord été purifiés sur gel, puis ré-amplifiés par PCR et re-purifiés (sans passage sur gel). Les produits d'amplification résultant de l'utilisation des amorces « primiR amont » ont quant à eux été directement purifiés sans passage sur gel.

Restrictions diagnostiques

Les produits amplifiés par la PCR réalisée avec les amorces « primiR2 » ont été digérés pendant 1/2h à température ambiante par l'enzyme de restriction SmaI (table 2.20). Le contrôle positif de cette digestion enzymatique a été réalisé en digérant du plasmide pSKoriTKan préalablement digéré par EcoRV (cette digestion est décrite par après) et purifié en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Les produits amplifiés par la PCR réalisée avec les amorces « pri-miR amont » ont quant à eux été digérés pendant 45 min à 37°C avec les enzymes XbaI ou AatII. Une fois le temps de digestion écoulé, les produits de restriction ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% additionné de bromure d'éthidium.

Quantification par PCR en temps réel de l'expression du pri-miR-132/212

Les échantillons d'ARN issus d'une extraction au TRI Reagent Solution, traités à la DNase et rétro-transcrits selon le protocole décrit précédemment sont utilisés afin de quantifier l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel en mélangeant les réactifs listés à la table 2.21 puis en répartissant 2 fois 20 μ l de ce mélange dans deux puits d'une plaque 96 puits. La dilution finale de l'ADNc engagé lors de la réaction a été déterminée au cours de mises au point durant lesquelles des facteurs de dilution 5X, 50X et 500X ont été testés. Les PCR en temps réel sont effectuées dans un 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en suivant un programme composé des phases suivantes : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles de 15 sec à 95°C et d'1 min à 60°C. L'expression relative du pri-miR-132/212 est mesurée en normalisant les résultats à l'abondance de la GAPDH (utilisée comme contrôle endogène) et en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

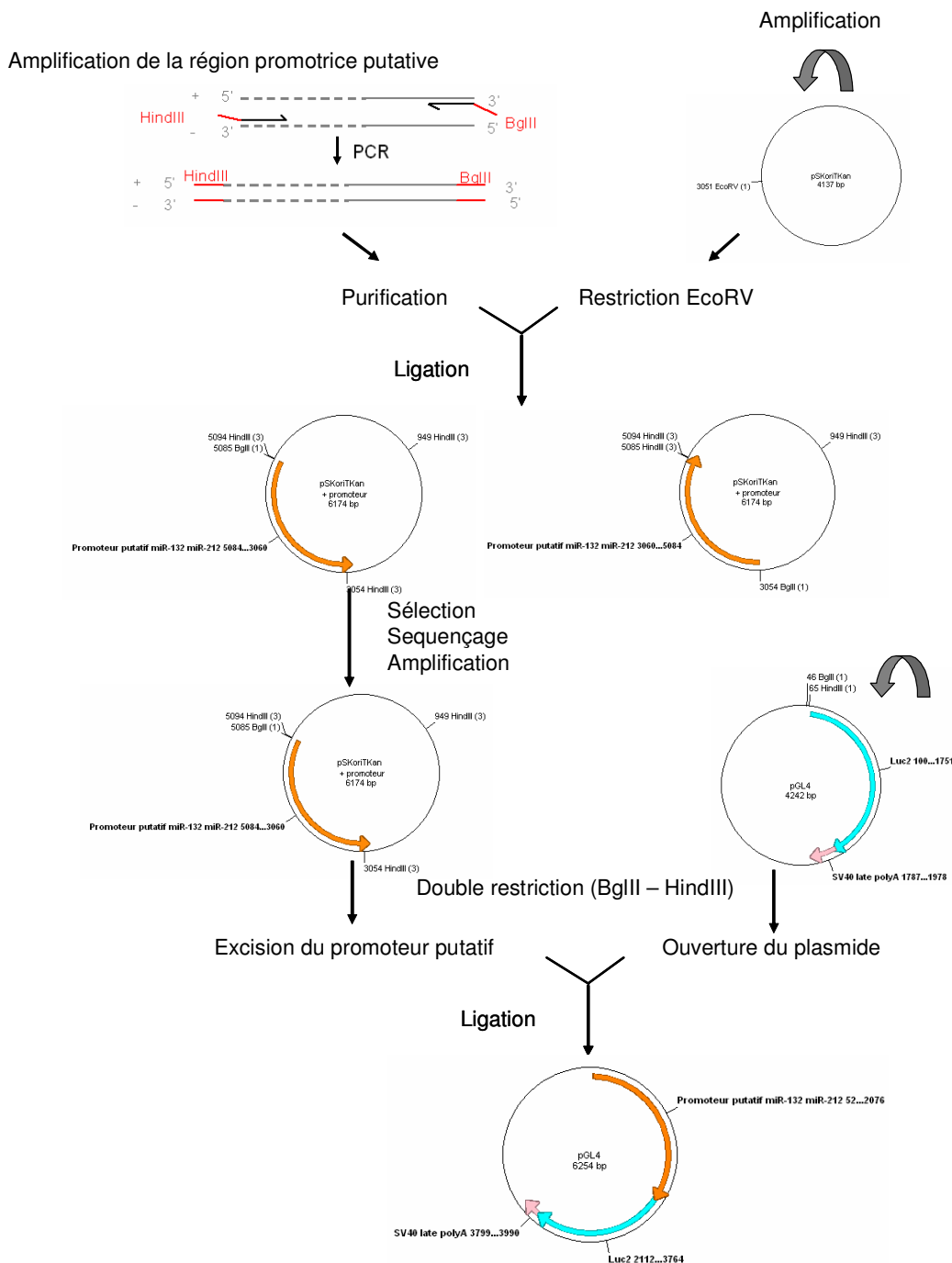


Figure 2.5 : Stratégie de clonage d'une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 dans le plasmide rapporteur pGL4.10. Tout d'abord, la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 est amplifiée en utilisant des amorces contenant les sites de restriction des enzymes BglII et HindIII. Ces sites de restrictions permettent un clonage directionnel de la région amplifiée dans le site multiple de clonage situé en amont du gène de la luciférase (luc2) encodé par le plasmide pGL4.10. La région promotrice putative est amplifiée par PCR puis purifiée et clonée dans un plasmide intermédiaire, le pSKoriTKan, préalablement ouvert grâce à une digestion EcoRV (qui génère des extrémités franches). Ces plasmides sont ensuite transformés en bactéries, sélectionnés, amplifiés, et la région promotrice clonée est séquencée. Le plasmide pSKoriTKan + promoteur est ensuite digéré avec les enzymes BglII et HindIII, qui excisent la région promotrice du plasmide (le clonage dans ce plasmide intermédiaire est nécessaire pour permettre une restriction efficace par ces enzymes, étant donné que les enzymes de restriction ne restreignent pas efficacement les sites situés aux extrémités d'un fragment d'ADN). Le plasmide rapporteur, préalablement amplifié en bactéries, est également restreint par ces deux enzymes. Les produits de restriction sont ensuite ligués ensemble, ce qui permet l'insertion de la région promotrice putative en amont du gène de la luciférase encodé par le plasmide rapporteur. Ce plasmide peut ensuite être transfecté en cellules THP-1.

V. Construction d'un plasmide rapporteur encodant un promoteur putatif des miR-132 et miR-212 et transfection de ce plasmide dans les cellules THP-1

V.1. Principe

Afin d'analyser la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212, nous avons cloné un promoteur putatif de ces deux miRNAs en amont du gène de la luciférase de Firefly (Luc2) encodé par le plasmide rapporteur pGL4.10 Luc2 (Promega). La stratégie de clonage poursuivie est illustrée à la figure 2.5.

V.2. Construction du plasmide rapporteur

V.2.a. Extraction de l'ADN génomique de cellules THP-1 et tentatives d'amplification du promoteur avec la Phusion polymérase

Initialement, l'objectif était d'amplifier le promoteur des miRNAs à partir d'ADN génomique de cellules THP-1 pour ensuite réaliser le clonage. Brièvement, l'ADN génomique a été extrait de 1.10^6 monocytes en utilisant le kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) en suivant le protocole du fabricant. Les tentatives d'amplification de la région promotrice putative ont été réalisées avec la Phusion polymérase (Finnzyme) en présence des différents tampons de l'enzyme, avec (3%) et sans DMSO, en testant deux concentrations d'ADN matrice (125 et 250 ng/50 µl de réaction) et les amorces « promoteur 1 » (les séquences de ces amorces sont indiquées à la table 2.23) à une concentration finale de 0,5 µM. Malgré beaucoup d'aspécificité (en dépit des gradients de température testés lors de l'amplification), une bande de taille attendue a été purifiée avec le kit ® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), clonée dans le pSKoriTKan préalablement restreint avec EcoRV puis séquencée. Etant donné que la séquence clonée était différente du promoteur putatif des miR-132 et miR-212, des BAC (bacterial artificial chromosome) comportant un fragment de la région chromosomique 17p13.3 du génome humain ont finalement été utilisés comme matrice pour amplifier la région promotrice des miR-132 et miR-212.

V.2.b. Amplification et extraction des BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

La composition des milieux utilisés pour permettre la croissance des bactéries DH10E transformées par le BAC RP11-357O7 est indiquée à la table 2.22.

Les clones comportant le BAC RP11-357O7 (BACPAC) ont été reçus dans un petit bloc d'agar, ensemencés sur milieu agar solide contenant du chloramphénicol (sélection des bactéries comportant le BAC) et cultivés pendant environ 16h à 37°C. Le lendemain, quelques colonies ont été amplifiées par mini- puis maxi-cultures en présence de chloramphénicol.

Les BAC ont été extraits des maxi-cultures en utilisant le Large Construct Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

Milieu LB solide (pour 5 boîtes de Pétri)	
Bacto™ Agar (Becton, Dickinson and Company)	1,5 g
Difco™ LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company)	2 g
H ₂ O	100 ml
Chloramphénicol	20 µg/ml
Milieu LB liquide (pour 500 ml)	
Difco™ LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company)	10 g
H ₂ O	500 ml
Chloramphénicol	20 µg/ml

Table 2.22 : Composition des milieux utilisés pour l'amplification des bactéries DH10E comportant le BAC RP11-35707.

Composition du mélange PCR		Concentration
H ₂ O		Variable
Tampon Colorless GoTaq™ Reaction Buffer 5X (Promega)		1/5 du volume final
dNTP Master Mix (Eurogentec)		1/100 du volume final
Amorces (Eurogentec)	Promoteur1 Sens : 5'- <u>AAG CTT</u> AGC AGT CTA GAG CCA A-3'	0,5 µM
	Promoteur1 Antisens : 5'- <u>AGA TCT</u> TCC TGT GCA CTT CAC-3'	0,5 µM
BAC RP11-35707 extrait des bactéries DH10E		2,5 ng/µl de réaction
GoTaq™ DNA Polymérase (Promega)		0,025 U/µl de réaction

Table 2.23 : Composition du mélange PCR pour l'amplification du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 à partir de BAC RP11-35707.

Produits d'amplification du promoteur purifiés	8 µl
H ₂ O	8 µl
Tampon A 10X (Roche)	2 µl
Enzyme SacI (Roche)	1 µl
Enzyme HpaI (Roche)	1 µl

Table 2.24 : Composition du mélange de restriction du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 par les enzymes SacI et HpaI.

Plasmide pSKoriTKan	1 µg
H ₂ O	Pour porter à un volume final de 20 µl
Tampon B 10X (Roche)	2 µl
Enzyme EcoRV (Roche)	1 µl

Table 2.25 : Composition du mélange de restriction du pSKoriTKan par l'enzyme EcoRV.

Promoteur putatif des miR-132 et -212 amplifié par PCR puis purifié	77,5 µl
Tampon HF 5X concentré (Finnzyme)	20 µl
Phusion polymérase (Finnzyme)	0,5 µl
dNTP Master Mix (Eurogentec)	2 µl

Table 2.26 : Elimination des nucléotides protrudants du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 par traitement à la Phusion polymérase.

pSKoriTKan restreint par EcoRV et purifié	100 ng
Région promotrice putative amplifiée par la GoTaq polymérase, purifiée puis traitée à la Phusion polymérase et à nouveau purifiée	492 ng (ratio molaire insert/vecteur de 10X)
Tampon de la T4 DNA Ligase 10X (Promega)	1 µl
H ₂ O	Pour porter à un volume final de 10 µl
T4 DNA Ligase (Promega)	1,5 U

Table 2.27 : Composition du mélange de ligation du promoteur putatif dans le pSKoriTKan linéarisé par EcoRV.

V.2.c. Amplification par PCR de la région promotrice putative des miR-132 et -212

La région promotrice putative des miR-132 et miR-212 a été amplifiée avec succès en réalisant le mélange PCR indiqué à la table 2.23 et en suivant le programme d'amplification suivant (dans un Peltier Thermal Cycler PTC-225): 2 min de dénaturation à 95°C suivies par 5 cycles composés de 30 sec de dénaturation à 95°C ; 30 sec d'hybridation des amorces à 46°C et 2 min d'élongation à 72°C puis de 25 autres cycles composés de 30 sec de dénaturation à 95°C ; 30 sec d'hybridation des amorces à 60°C et 2 min d'élongation à 72°C. Ces cycles ont été suivis de 10 min d'élongation finale à 72°C avant que les produits ne soient refroidis à 4°C puis visualisés sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium, en présence de l'étalon Benchtop 1kb DNA Ladder (Promega). L'amplification de la région promotrice putative a également été testée en utilisant la Phusion polymérase (Finnzyme), une enzyme exerçant une activité de relecture et possédant donc un taux d'erreur plus bas, mais sans succès.

V.2.d. Purification et restriction diagnostique de la région promotrice putative

Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) et une fraction de ceux-ci a été digérée pendant 1h à 37°C par les enzymes de restriction SacI et HpaI (mélange de restriction à la table 2.24) afin de permettre une première identification de la région promotrice putative. Les produits de restriction ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium.

V.2.e. Clonage de la région promotrice putative des miR-132/212

Restriction du pSKOriTKan par l'enzyme EcoRV

Le plasmide intermédiaire pSKOriTKan, offert par le Professeur De Bolle (URBM, FUNDP) a été restreint par l'enzyme EcoRV pendant 2h15 à 37°C (voir table 2.25). Etant donné que cette enzyme ne s'inactive pas à la chaleur, les produits de restriction ont été purifiés avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) avant le clonage de la région promotrice.

Clonage du promoteur putatif dans le pSKOriTKan

Etant donné que le plasmide restreint par EcoRV possède des extrémités franches alors que les produits amplifiés par la GoTaq polymérase comportent des extrémités protrudantes, le promoteur putatif des miRNAs amplifié par PCR et purifié a été incubé pendant 5 min à 68°C avec de la Phusion polymérase (Finnzyme) (voir table 2.26) qui, grâce à son activité exonucléase 3'→5' a permis le retrait des nucléotides protrudants et donc la génération d'extrémités franches. Suite à cette réaction, les produits PCR ont à nouveau été purifiés avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Le pSKOriTKan et la région promotrice putative ont ensuite été ligués ensemble en incubant le mélange indiqué à la table 2.27 pendant 18h à température ambiante, puis ces produits de ligation ont été transformés en bactéries DH10B compétentes.

Milieu LB solide contenant kanamycine, X-Gal et IPTG (pour 5 boîtes de Pétri)	
Bacto™ Agar (Becton, Dickinson and Company)	1,5 g
Difco™ LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company)	2 g
H ₂ O	100 ml
Kanamycine	50 µg/ml
X-Gal (Promega)	80 µg/ml
IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Sigma)	0,5 mM
Milieu LB liquide supplémenté en kanamycine (pour 500 ml)	
Difco™ LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company)	10 g
H ₂ O	500 ml
Kanamycine	50 µg/ml

Table 2.28 : Composition des milieux utilisés pour la transformation de bactéries DH10B par le pSKOriTKan + promoteur, la sélection des clones et leur amplification.

Composition des mélanges de PCR		Quantité (pour 20 µl de réaction)
H ₂ O		13,4 µl
Tampon Colorless GoTaq™ Reaction Buffer 5X (Promega)		4 µl
dNTP Master Mix (Eurogentec)		0,2 µl
Amorces	M13 Reverse	1 µM
	Promoteur5 antisens : 5' AGC-GCG-TCA-GTG-TGT-AG 3' (Eurogentec)	1 µM
Mini-prep de pSKOriTKan + insert		2 µl
GoTaq™ DNA Polymérase (Promega)		0,025 U/µl de réaction
Programme d'amplification PCR		Durée et température
Dénaturation initiale		5 min à 94°C
Cycles d'amplification (35 cycles)		30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 51°C et 1 min d'élongation à 72°C
Elongation finale		10 min à 72°C

Table 2.29 : PCR réalisées afin d'identifier les clones transformés par un pSKOriTKan + promoteur inséré dans l'orientation désirée.

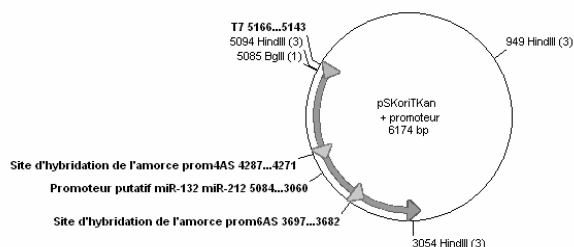


Figure 2.6 : Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage du promoteur putatif cloné.

H ₂ O	Pour porter à 20 µl
Tampon B 10X (Promega)	2 µl
ADN (soit plasmide pGL4.10 Luc2 ; soit plasmide pSKOriTKan + promoteur)	1 µg
Enzyme BglII (Promega)	1 µl
Enzyme HindIII (Promega)	1 µl

Table 2.30 : Composition des mélanges de restriction du pGL4.10 Luc2 ou de différents clones pSKOriTKan + promoteur dans l'orientation désirée par les enzymes BglII et HindIII.

pGL4.10 Luc2 restreint par BglII et HindIII	100 ng
Région promotrice putative excisée du pSKOriTKan par BglII et HindIII	750 ng (ratio molaire insert/vecteur de 5X)
Tampon de la T4 DNA Ligase 10X (Promega)	2 µl
T4 DNA Ligase (Promega)	3 U

Table 2.31 : Composition du mélange de ligation du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2.

V.2.f. Transformation du pSKOriTKan+promoteur en bactéries DH10B

Les bactéries DH10B compétentes ont été dégelées pendant 20 min sur glace, puis incubées pendant encore 20 min sur glace avec les 10 µl de produits de ligation. Un choc thermique de 2 min 30 sec à 42°C a ensuite été réalisé, puis 900 µl de milieu LB sans antibiotique et préchauffé à 37°C ont été ajoutés et les bactéries mises au repos pendant 45 min à 37°C et 250 RPM. Les bactéries transformées ont été étalées sur du milieu LB solide (table 2.28) contenant de la kanamycine (pour sélectionner les bactéries transformées par le pSKOriTKan), du X-Gal et de l'IPTG (en présence de ces molécules, les bactéries transformées par un plasmide sans insert apparaissent bleues, tandis que celles transformées par un plasmide avec insert apparaissent blanches suite à la disruption du gène LacZ encodé par le plasmide) et placées pendant 16h à 37°C.

V.2.g. Amplification des bactéries transformées par le pSKOriTKan+promoteur, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide

Le lendemain de la transformation, des mini-cultures et ensuite des maxi-cultures ont été réalisées à partir des colonies blanches. Les plasmides ont été extraits d'une partie des mini-cultures en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant et une PCR a été réalisée afin de déterminer quels clones possédaient l'insert promoteur avec l'orientation désirée. En effet, comme illustré à la figure 2.5, la région promotrice peut se liguer selon deux orientations dans le pSKOriTKan étant donné que les extrémités sont franches. Or, dans un des deux cas (« pSKOriTKan + promoteur » représenté à droite sur la figure 2.5), le site de restriction HindIII ajouté à la région promotrice lors de son amplification se retrouve à quelques nucléotides seulement d'un site HindIII présent dans le plasmide. Ainsi, si la restriction réalisée par la suite dans le but de libérer la région promotrice du pSKOriTKan ne s'effectuait pas correctement, on risquerait de cloner le promoteur bordé d'un fragment du pSKOriTKan dans le plasmide rapporteur. Les clones comportant la bonne orientation (« pSKOriTKan + promoteur » à gauche sur la figure 2.5) ont donc été identifiés à la suite des résultats d'une PCR (voir table 2.29). Les plasmides de cinq clones comportant l'insert dans sa bonne orientation ont été extraits en utilisant le Qiagen Plasmid *Plus* Midi Kit (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant et séquencés chez Beckman Coulter Genomics en utilisant les amorces standard T7, prom4AS (5' GTC-CAG-GAA-CTG-AGG-AG 3') et prom6AS (5' CAG-AGA-CGA-CAC-GAG-C 3') (Eurogentec) (le positionnement de ces amorces est illustré à la figure 2.6).

V.2.h. Clonage du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2

Le promoteur putatif des miRNAs a été excisé des plasmides pSKOriTKan suite à une restriction simultanée par les enzymes de restriction BglII et HindIII. Le plasmide pGL4.10 Luc2 (Promega) a également été restreint avec ces enzymes afin de permettre le clonage du promoteur putatif. Ces restrictions ont été effectuées en incubant les mélanges indiqués à la table 2.30 pendant 1h à 37°C puis 15 min à 65°C afin d'inactiver les enzymes. Les produits de restriction (région promotrice putative des miR-132 et -212 et pGL4.10) ont ensuite été ligués ensemble (voir table 2.31) pendant 4h à température ambiante.

Composition du mélange PCR					Quantité (pour 50 µl de réaction)
H ₂ O					38,25 µl
Tampon Colorless GoTaq™ Reaction Buffer 5X (Promega)					10 µl
Amorces	Promoteur 5 Sens : 5' CTA-CAC-ACT-GAC-GCG-CT 3'				1 µM
	Promoteur 4 Antisens : 5' GTC-CAG-GAA-CTG-AGG-AG 3'				1 µM
GoTaq™ DNA Polymérase (Promega)					0,025 U/µl de réaction
Cycles d'amplification PCR					Durée et température
Dénaturation initiale					5 min à 94°C
Cycles d'amplification (35 cycles)					30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 51°C et 30 sec d'élongation à 72°C
Elongation finale					10 min à 72°C

Table 2.32 : Composition du mélange PCR utilisé pour réaliser les PCR sur colonies visant à identifier les clones bactériens comportant un plasmide pGL4.10 Luc2 au sein duquel est cloné le promoteur putatif des miRNAs.

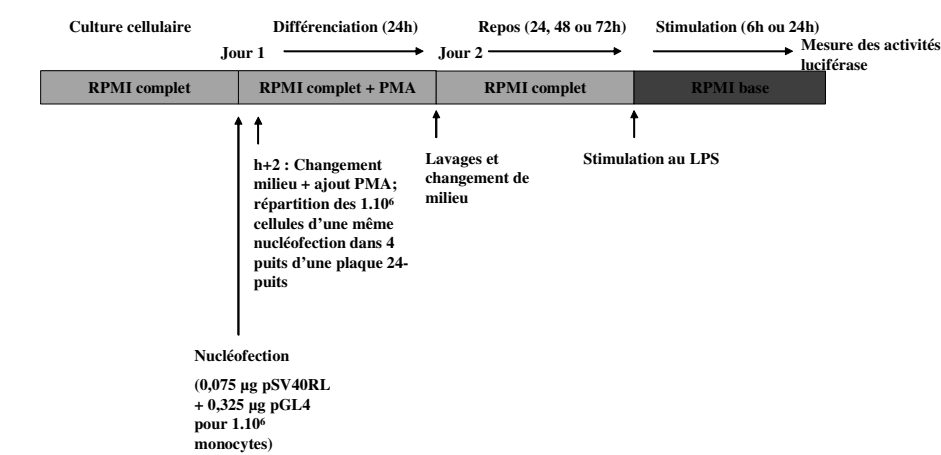


Figure 2.7 : Chronologie des manipulations réalisées depuis la nucléofection de la construction rapportrice jusqu’à la révélation des activités luciférase.

Agents de transfection	Lipofectamine TM 2000 Reagent (Invitrogen)
	JetPEI TM Macrophages (Polyplus Transfection TM)
	Attractene Transfection Reagent (Qiagen)
	DEAE dextran Transfection Kit (Sigma)
	Nucleofector Kit V (Amaxa)
Milieux	OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco)
	RPMI base (voir table 2.1)
	RPMI complet (voir table 2.1)
Plasmides	pCMV-βGal (Clontech)
	pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les nucléofections)
	pSV40RL (Promega)
	pGL4.10[luc2] avec ou sans promoteur clone (Promega)
Plaques de culture 24 puits (Costar, Corning)	
T25 (Costar, Corning)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf)	

Table 2.33 : Matériel utilisé lors des mises au point de transfection de plasmide.

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)	Passive Lysis Buffer 5X (à diluer dans de l'H ₂ O)
	Luciferase Assay Substrate resuspendu dans du Luciferase Assay Buffer II
	Stop&Glo® substrate 50X dilué dans du Stop&Glo® Buffer juste avant la lecture des activités luciférase
PBS pH 7,4	NaCl 150 mM
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM
Luminomètre Berthold FB12 (Berthold Detection Systems)	
Tubes Röhrchen (Sarstedt)	

Table 2.34: Matériel utilisé pour les mesures des activités luciférases de Firefly et de Renilla.

V.2.i. Transformation du pGL4.10 Luc2 + promoteur en bactéries DH10B, amplification des bactéries transformées, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide

Les produits de ligation du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2 ont été transformés en bactéries DH10B compétentes selon le protocole détaillé précédemment, à l'exception des milieux de culture qui ont été complétés en ampicilline (100 µg/ml) (au lieu de kanamycine, X-Gal et IPTG). Etant donné que le plasmide pGL4.10 ne comporte pas de système de criblage blanc-bleu, des PCR sur colonies ont été réalisées afin de déterminer quels clones comportaient des plasmides contenant la région promotrice. Ces PCR ont été réalisées en prélevant un fragment d'une colonie avec la pointe d'un tips et en le déposant dans le mélange PCR indiqué à la table 2.32. Les clones pour lesquels un produit d'amplification de taille attendue a été observé ont été amplifiés en milieu complété en ampicilline. Leurs plasmides ont été extraits avec le Qiagen Plasmid *Plus* Maxi Kit (Qiagen) en suivant le protocole fourni par le fabricant.

V.3. *Transfection du plasmide rapporteur dans les THP-1*

V.3.a. Optimisation de transfection plasmidique

Les optimisations de transfection plasmidique ont été réalisées en utilisant les réactifs présentés à la table 2.33 dans les conditions résumées à la table 2.35. Ces protocoles ont été adaptés selon les recommandations fournies par les fabricants.

Initialement, nous avons transfecté un plasmide pCMV-βGal (plasmide encodant le gène de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur viral du cytomégalo virus) afin de déterminer le taux de transfection. Cependant, l'analyse de l'activité β-Galactosidase (déterminée par l'utilisation du kit β-Gal Staining Set de Roche, en suivant le protocole fourni par le fabricant) n'a permis de détecter aucune cellule transfectée parmi les différentes conditions testées. Nous avons donc poursuivi les essais d'optimisation de transfection à l'aide d'un plasmide pEGFP, plus facile à transfecter de par sa plus petite taille. Seule la Lipofectamine 2000 a permis de transfecter ce plasmide. Cependant, les résultats obtenus lors de la transfection de la construction rapportrice et l'analyse de l'activité luciférase ont suggéré que ce taux de transfection était trop faible que pour permettre une analyse reproductible de l'activité du promoteur. Nous avons donc testé un protocole de nucléofection, lequel nous a permis de transfecter un nombre satisfaisant de cellules (voir figure 3.17).

V.3.b. Nucléofection et stimulation des cellules

Les nucléofections de la construction rapportrice sont réalisées dans les conditions résumées à la table 2.36. Brièvement, 1.10^6 monocytes sont resuspendus dans 100 µl de solution V (Amaxa, Nucleofector Kit V) en présence de 0,4 µg de plasmide. Ces cellules sont placées dans les cuvettes fournies dans le kit et nucléofectées en sélectionnant le programme U-001. Immédiatement après, 500 µl de RPMI complet sont ajoutés et les cellules sont transférées dans un puits contenant 800 µl de RPMI complet préchauffé. Deux heures après cette transfection, les cellules sont transférées en tubes, centrifugées 5 min à 0,3 g et resuspendues dans du RPMI complet (avec ou sans PMA). Les cellules issues d'une même nucléofection

Agent transfectant	Mélange de transfection		Etat de différenciation lors de la transfection	Mise au repos après transfection	Différenciation avant/après la transfection	Nombre de cellules transfectées par puits d'une plaque 24 puits
	Mélange 1 (Dilution de l'agent transfectant)	Mélange 2 (ADN)				
Lipofectamine TM 2000 Reagent (Invitrogen)	1,5 µl + 48,5 µl d'Opti-MEM	0,7 µg de pGL4.10 + 0,3 µg de pCMV-βGal dans un Vf de 50 µl d'OptiMEM	Macrophages	Ajout de 400 µl de RPMI complet après 4h de transfection	Addition du PMA 24h avant la transfection	200 000 dans 400 µl de RPMI complet
	1,75 µl + 48,25 µl d'Opti-MEM					
	2,0 µl + 48 µl d'Opti-MEM					
	2,25 µl + 47,25µl d'Opti-MEM					
JetPEI TM Macrophages (Polyplus TM) Transfection TM)	1,6 µl + 48,4 µl d'Opti-MEM	0,15 µg pSV40RL + 0,65µg pEGFP dans un volume de 50 µl d'Opti-MEM	Monocytes	Ajout de 400 µl de RPMI complet après 4h de transfection	Addition du PMA 24h après la transfection	300 000 et 600 000 dans 500 µl de RPMI complet
	2,0 µl + 48 µl d'Opti-MEM					
	2,4 µl + 47,6 µl d'Opti-MEM					
	1,6 µl + 48,4 µl d'Opti-MEM					
Attractene Transfection Reagent (Qiagen)	2,6 µl dans 50 µl de solution NaCL 150 mM	2,5 µg de pEGFP dans 50 µl de solution NaCl	Monocytes	Ajout de 300 µl de RPMI complet + PMA 4h après la transfection	Addition du PMA lors de la mise au repos (4h après la transfection)	400 000 dans 200 µl de RPMI complet
		1,25 µg de pSV40RL+ 1,25 µg de pEGFP dans 50 µl de solution NaCl				
	1,0 µl dans le mélange 2	0,27 µg de pSV40RL + 0,13 µg pCMV-βGal dans 60 µl RPMI base	Macrophages	Non	Différenciation avant la transfection	250 000 dans 500 µl de RPMI complet
	1,5 µl dans le mélange 2					
	3,0 µl dans le mélange 2					
	1,5 µl dans le mélange 2	0,4 µg de pSV40RL + 0,2 µg de pCMV-βGal dans 60 µl RPMI base				
	2,25 µl dans le mélange 2					
	4,5 µl dans le mélange 2					
	1,5 µl dans le mélange 2	0,27 µg de pSV40RL + 0,13 µg pCMV-βGal dans 60 µl RPMI base	Monocytes	Ajout de 500 µl de RPMI complet + PMA après 5h de transfection	Différenciation lors de la mise au repos	400 000 dans 500 µl de RPMI complet

DEAE dextran Transfection Kit (Sigma)	0,67 µg pSV40RL + 0,33 µg pCMV-βGal + 0,28 µl DEAE + 17,2 µl TBS	Monocytes	Oui, après 15 min de transfection (le protocole classique inclut cette mise au repos par retrait des complexes après centrifugation et resuspension des cellules dans 500 µl de RPMI complet)	Différenciation 4h après la mise au repos	400 000 (la transfection se fait sur le culot de cellules)
	1,25 µg de pSV40RL + 1,25 µg de pEGFP + 17,2 µl TBS + 0,28 µl DEAE		Oui, après 15 min de transfection		
	0,5 µg de pSV40RL + 2 µg de pEGFP + 17,2 µl TBS + 0,28 µl DEAE		Oui, après 30 min de transfection		
	2,5 µg de pEGFP + 17,2 µl TBS + 0,28 µl DEAE		Oui, après 15 min de transfection		
Nucléofection (Amaya, Nucleofector Kit V) (programme U-001)	0,075 µg pSV40RL + 0,325 µg pEGFP (fourni dans le kit)	Monocytes	Ajout de 500 µl de RPMI complet directement après la nucléofection puis changement du milieu 2h après la nucléofection	Pas de différenciation	1.10 ⁶ cellules/nuéofection
	100 µl de solution V contenant 1.10 ⁶ cellules			Ajout du PMA lors du changement de milieu (2h après la nucléofection)	

Table 2.35 : Agents de transfection et conditions testées lors des mises au point de transfection de plasmide en plaque 24 puits.

Agent transfectant	Mélange de transfection		Etat de différenciation lors de la transfection	Mise au repos après transfection	Différenciation avant/après la transfection	Nombre de cellules transfectées par puits d'une plaque 24 puits	Stimulation au LPS
	Mélange 1 (Dilution de l'agent transfectant)	Mélange 2					
Lipofectamine [™] 2000 Reagent (Invitrogen)	1,6 µl + 48,4 µl d'Opti-MEM	0,075 µg de pSV40RL + 0,325 µg pGL4.10-promoteur (3 clones testés)	Monocytes	Ajout de 400 µl de RPMI complet 4h après la transfection	Pas de différenciation mais stimulation au LPS 48h après la transfection	600 000 dans 500 µl de RPMI complet	Stimulation pendant 6h au LPS 48h après la transfection
		0,075 µg de pSV40RL + 0,325 µg pGL4.10-promoteur (3 clones testés) ou pGL4.10		Ajout de 400 µl de RPMI complet + PMA 4h après la transfection	Différenciation lors de la mise au repos		Stimulation pendant 24h au LPS 48h après la transfection
Nucléofection (Amaya, Nucleofector Kit V) (programme U-001)	100 µl de solution V contenant 1.10 ⁶ cellules	0,075 µg pSV40RL + 0,325 µg pGL4.10-promoteur ou pGL4.10 sans promoteur	Monocytes	Aajout de 500 µl de RPMI complet directement après la nucléofection puis changement du milieu 2h après la nucléofection	Pas de différenciation	1.10 ⁶ cellules/nuélofection réparties en 2 puits d'une plaque 24 puits (un puits est par la suite stimulé au LPS, l'autre sert de CTL)	Stimulation pendant 6h ou 24h au LPS 24h après la nucléofection
					Aajout de PMA lors du changement de milieu (2h après la nucléofection)		Stimulation pendant 6h et 24h au LPS - 48h après la nucléofection
							Stimulation pendant 24h au LPS - 72h après la nucléofection

Table 2.36 : Agents de transfection et conditions testées lors des essais de transfection de la construction pGL.10-promoteur.

sont ensuite réparties dans 2 ou 4 (selon les manipulations) puits d'une plaque 24 puits. Les cellules différenciées au PMA durant 24h sont ensuite mises au repos pendant 24, 48 ou 72h, avant d'être stimulées au LPS pendant 6h ou 24h (les conditions contrôle et LPS sont testées sur des cellules issues d'une même nucléofection). La chronologie de ces manipulations est illustrée à la figure 2.7. Des essais ont également été réalisés sur des cellules non différenciées, stimulées pendant 6h au LPS 24h après la nucléofection.

V.3.c. Analyse des activités luciférase de Firefly et de Renilla

Principe

Afin de normaliser les activités luciférase mesurées à l'efficacité de la transfection, les cellules ont initialement été co-transfectées avec un second plasmide (le pSV40RL) encodant le gène de la luciférase de Renilla sous le contrôle du promoteur SV40 (Simian virus 40). Théoriquement, l'activité de ce promoteur étant constitutive, l'activité luciférase de Renilla devrait être directement proportionnelle au nombre de cellules transfectées. L'activité de la luciférase de Firefly, qui dépend à la fois de l'activité du promoteur putatif des miRNAs et de l'efficacité de la transfection, a donc été normalisée par rapport à l'activité luciférase de Renilla, elle-même ne dépendant normalement que de l'efficacité de la transfection. Cependant, nous avons remarqué que l'activité luciférase de Renilla variait entre les cellules stimulées ou non au LPS provenant d'une même nucléofection. Or, ces cellules, qui ont été nucléofectées en même temps, sont supposées avoir été transfectées avec une efficacité identique. Lors des manipulations suivantes, l'activité luciférase de Firefly a été normalisée au contenu protéique, déterminé par dosage de Pierce.

Méthode

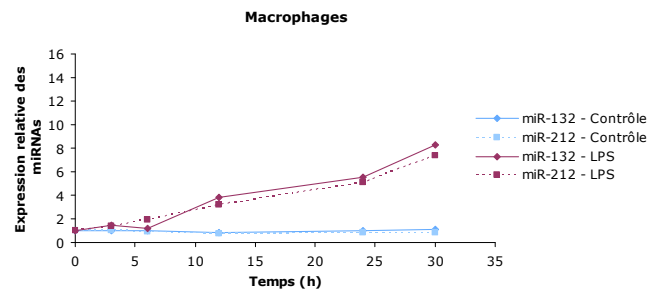
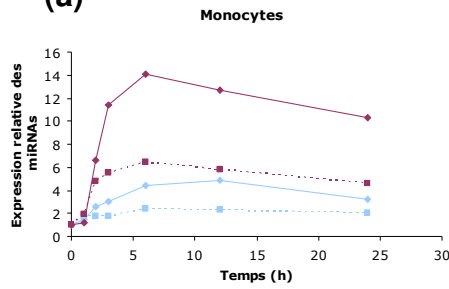
6 et 24h après la stimulation des cellules, les activités luciférase de Firefly et de Renilla sont mesurées (le matériel utilisé afin de réaliser ces mesures est listé à la table 2.34). Les cellules sont lavées deux fois au PBS puis lysées pendant 15 min sous agitation dans du tampon de lyse (100 µl/puits d'une plaque 24 puits). Le lysat est ensuite centrifugé pendant 3 min à 13 000 RPM et le surnageant est récolté. L'activité luciférase de Firefly est lue dans un luminomètre à l'obscurité suite à l'ajout de 20 µl de ce lysat cellulaire à 100 µl de Luciférase Assay Reagent II. Immédiatement après la lecture de l'activité luciférase de Firefly, 100 µl de solution Stop&Glo sont ajoutés et l'activité luciférase de Renilla est lue.

VI. Analyses statistiques

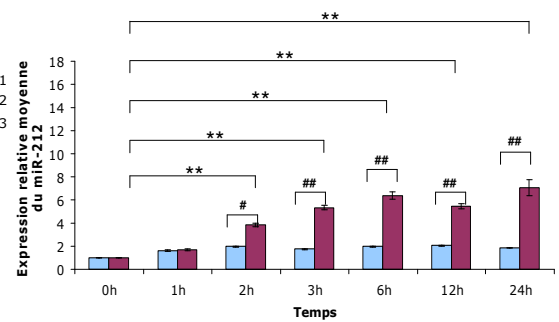
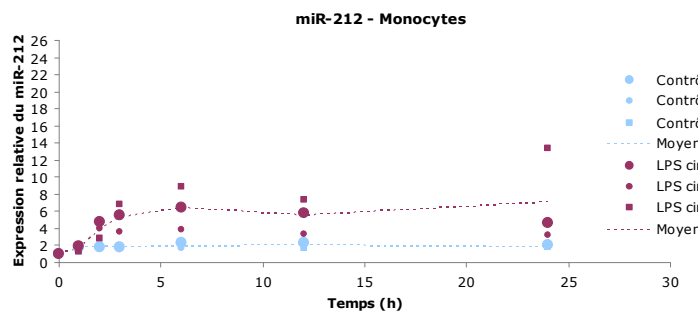
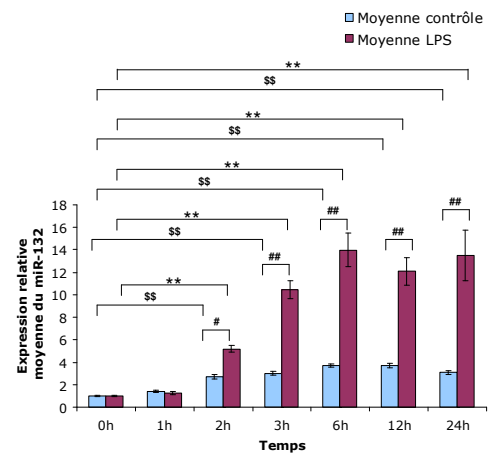
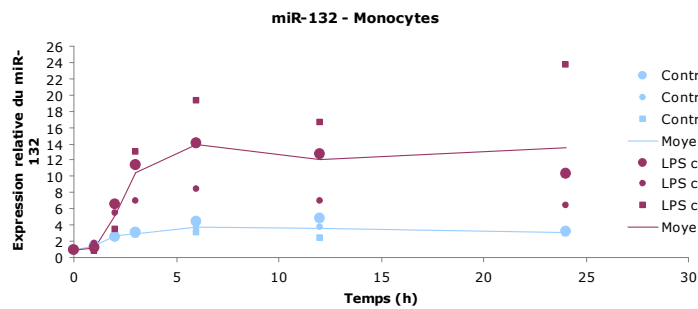
Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de ΔCt à l'aide du logiciel Sigma Stat 3.1. Les barres d'erreur des histogrammes présentés aux figures 3.1b, 3.1c et 3.5c représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de ΔCt . Brièvement, l'écart-type calculé à partir des valeurs de ΔCt des différents réplicats d'une condition est divisé par le ΔCt moyen de cette condition et ensuite multiplié par le fold d'expression moyen.

Résultats et discussion

(a)



(b)



(c)

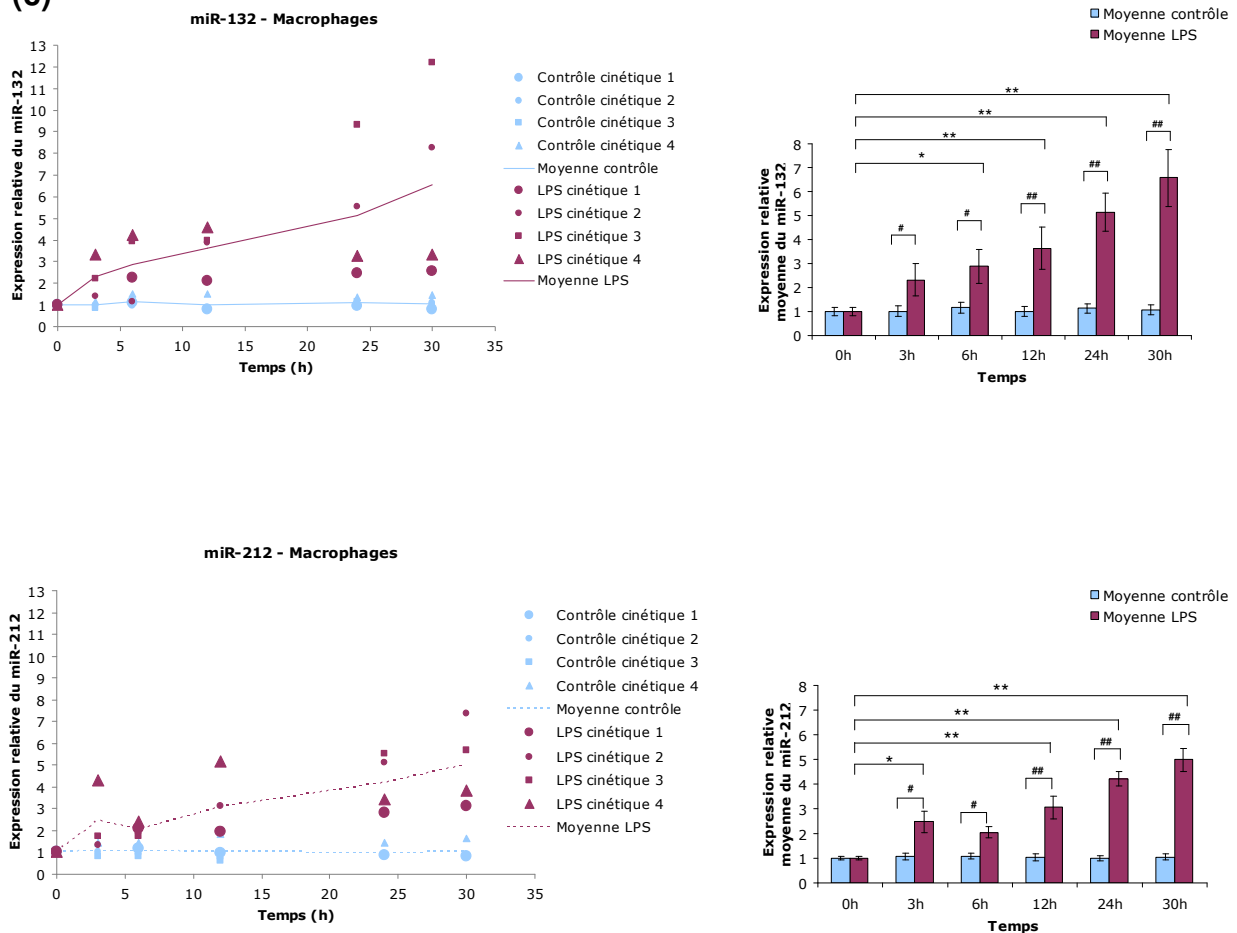


Figure 3.1 : Les miR-132 et miR-212 sont induits dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. Les cellules ont été stimulées avec 1 µg/ml de LPS ou incubées dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance des miRNAs (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative au temps 0. (a) Expression relative des miR-132 et miR-212 au cours d'une même expérience. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel, réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques. (b et c) Expression relative des miR-132 et miR-212 dans les monocytes (b) ou macrophages (c) stimulés au LPS mesurée au cours de trois (b) ou quatre (c) expériences indépendantes. Chaque symbole représente l'évolution de l'expression d'un miRNA au cours d'une expérience, tandis que la courbe représente la moyenne de l'expression relative de chaque miRNA. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative du miRNA et les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de ΔCt (voir Matériel et méthodes, point VI). Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de ΔCt (voir Matériel et méthodes, point VI). Les comparaisons intra-LPS sont représentées par des étoiles (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$), les comparaisons intra-contrôle sont représentées par des dollars (\$, $p < 0,05$; \$\$, $p < 0,01$), tandis que les comparaisons entre les cellules contrôles et stimulées sont représentées par des dièses (#, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$).

I. Les miR-132 et miR-212 sont induits lors de la stimulation au LPS des cellules THP-1

Etant donné qu'il a été rapporté que le miR-132 est induit lors de la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (Taganov et al., 2006) et que la configuration génomique des miR-132 et miR-212 humains suggère que ces miRNAs pourraient être transcrits de façon polycistronique, nous avons étudié leur expression dans des cellules THP-1 stimulées au LPS. Ces études ont été réalisées sur des cellules laissées indifférenciées (« monocytes ») ou préalablement différenciées (« macrophages ») par un traitement de 24h en présence de 0,02 µg/ml de PMA suivi de 24h de mise au repos (voir Matériel et méthodes, point I.3.a et figure 2.1). Nous avons extrait et rétro-transcrit l'ARN de monocytes et macrophages contrôles (cellules placées dans un milieu sans sérum étant donné que la stimulation au LPS se déroule en absence de sérum, voir Matériel et méthodes, point I.3.b) ou stimulés au LPS pendant des durées variables puis avons analysé l'expression des miR-132 et miR-212 par PCR en temps réel. Les résultats ont été normalisés à l'expression des miRNAs dans des cellules n'ayant pas subi de changement de milieu (temps 0).

Les résultats, présentés à la figure 3.1a, confirment que le miR-132 est surexprimé dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS et montrent pour la première fois que le miR-212 est également induit dans ces conditions, tant dans les cellules non différenciées que différenciées. De plus, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'expression parallèles. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle ces miRNAs pourraient être transcrits simultanément et ensuite être maturés à partir d'un même précurseur.

Afin de déterminer si l'induction des miR-132 et miR-212 par le LPS était un phénomène robuste, ces mesures ont été réalisées sur 3 (ou 4) cultures indépendantes de monocytes (figure 3.1b) et macrophages (figure 3.1c). Dans les monocytes (figure 3.1b), l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 survient rapidement (l'induction est déjà très significative après 2h de stimulation au LPS par rapport au temps 0), augmente fortement jusqu'à 6h de stimulation, pour ensuite se stabiliser ou très légèrement diminuer lors des plus longs temps de stimulation. Dans les macrophages (figure 3.1c), l'induction des miRNAs est plus lente et augmente graduellement jusqu'à plus de 30h de stimulation. On remarque que, bien que l'expression des miR-132 et miR-212 soit systématiquement induite par le LPS dans les monocytes et macrophages, l'amplitude de leur induction peut varier de façon importante d'une expérience à l'autre (figures 3.1b et 3.1c).

Les différences de cinétiques observées entre les monocytes et macrophages suggèrent que différents modes de régulation pourraient être impliqués dans l'expression des miR-132 et miR-212 selon l'état de différenciation des cellules. Il a d'ailleurs été démontré que les cellules THP-1 différenciées au PMA présentaient une activation plus élevée des JNK en réponse à une stimulation au LPS que les cellules non différenciées. Ceci pourrait résulter de l'expression prédominante de trois isoformes de JNK, JNK2α2 (p54 JNK), JNK1β1 et JNK2α1 (p46 JNK), dans les cellules différenciées. En effet, il a été rapporté que ces trois isoformes liaient c-Jun plus fortement que les autres isoformes de JNK (Dreskin et al., 2001). L'activation différentielle des JNK dans les macrophages pourrait donc avoir des répercussions sur l'expression des gènes qui dépendent des facteurs de transcription activés par ces isoformes de JNK. Les deux autres voies de MAPK, p38 et ERK, seraient également affectées par la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, la régulation de la

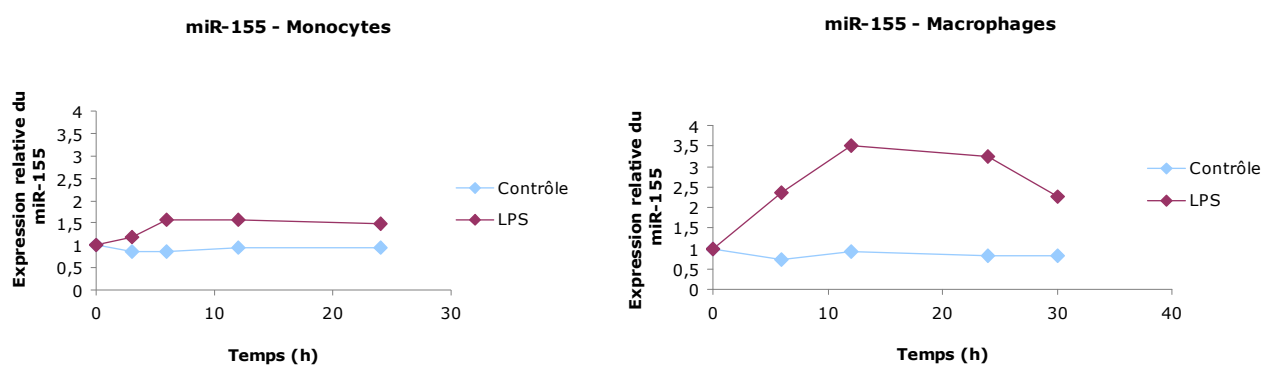


Figure 3.2 : Etude de l'expression du miR-155 dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS ou privés en sérum. Des monocytes ou macrophages ont été stimulés avec 1 µg/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance du miR-155, normalisée par celle du RNU-44, est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures réalisées sur une seule série d'extraits biologiques (les mêmes que ceux intitulés « cinétique 1 » aux figures 3.1b et 3.1c).

libération de cytokines en réponse à la stimulation au LPS de cellules humaines primaires dépend majoritairement de la voie p38 dans les monocytes et d'ERK dans les macrophages (différenciés *in vitro* ou prélevés *in vivo*) (Tudhope et al., 2008). Par ailleurs, il a été démontré que l'induction de cytokines observée en réponse à une stimulation au LPS de monocytes primaires de veau était nettement moins élevée que lorsque ces cellules étaient différenciées avant stimulation (Guo et al., 2009). Ces observations montrent qu'en fonction de leur état de différenciation, les cellules ne répondent pas de façon identique à une stimulation au LPS, ce qui pourrait expliquer les différences de cinétique d'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1.

Les résultats présentés à la figure 3.1b indiquent également que le miR-132 est induit dans les monocytes contrôles (c'est-à-dire placés dans un milieu sans sérum) par rapport aux cellules n'ayant pas subi de changement de milieu. Cette induction, bien que moins forte que celle résultant de la stimulation au LPS est cependant très significative dans les cellules privées en sérum pendant 2h ou de plus longues périodes, par rapport aux cellules placées dans du milieu complet. Or, il a été rapporté que le miR-132 était induit dans les pré-adipocytes et adipocytes humains primaires privés en sérum après seulement 1h de privation et que cette induction se prolongeait jusqu'à plus de 24h de privation (Strum et al., 2009). Le miR-132 et dans une moindre mesure le miR-212 (on observe également une légère induction, bien que non significative, de ce miRNA dans les cellules contrôles) pourraient donc également être induits par l'absence de sérum dans les monocytes THP-1.

Afin de nous assurer que l'induction des miR-132 et miR-212 dans les monocytes placés dans un milieu sans sérum est spécifique de ces miRNAs et non une propriété plus générale des miRNAs induits par le LPS, nous avons étudié l'expression du miR-155, un miRNA dont l'induction par le LPS a déjà été rapportée précédemment (Taganov et al., 2006). Comme le montre la figure 3.2, ce miRNA n'est pas induit dans les monocytes (ni dans les macrophages) contrôles. Ceci suggère que l'induction des miR-132 et miR-212 en absence de sérum ne représente pas une caractéristique générale des miRNAs induits par le LPS dans les cellules THP-1. Remarquons que l'induction des miR-132 et miR-212 observée dans les monocytes privés en sérum n'est pas reproduite dans les cellules préalablement différenciées au PMA (figure 3.1c). Ceci pourrait être expliqué, comme suggéré précédemment, par le fait que les cellules présentent selon leur état de différenciation des réponses variables aux stimulations auxquelles elles sont soumises.

Par ailleurs, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'induction assez semblables dans les macrophages stimulés au LPS, tandis que l'amplitude d'induction du miR-132 est nettement plus élevée que celle du miR-212 lorsque les cellules ne sont pas différenciées (figure 3.1a). Ceci suggère que la maturation et/ou la stabilité de l'un ou de l'autre miRNA pourrait être différente selon l'état de différenciation des cellules. Peu de choses sont cependant connues à propos du turn-over des miRNAs, tandis que les facteurs influençant leur maturation sont nombreux et souvent spécifiques de quelques miRNAs, ce qui rend ces hypothèses peu aisées à tester.

Il est généralement admis que la régulation transcriptionnelle serait la principale étape de contrôle de l'expression de la majorité des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008, Schanen and Li, 2010). Au cours de ce mémoire, nous avons considéré l'hypothèse que l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS serait dépendante de facteurs de transcription régulés par les conditions pro-inflammatoires, bien qu'on ne puisse exclure, *a priori*, un effet de la stimulation au LPS sur la maturation des miRNAs. En effet, il a été

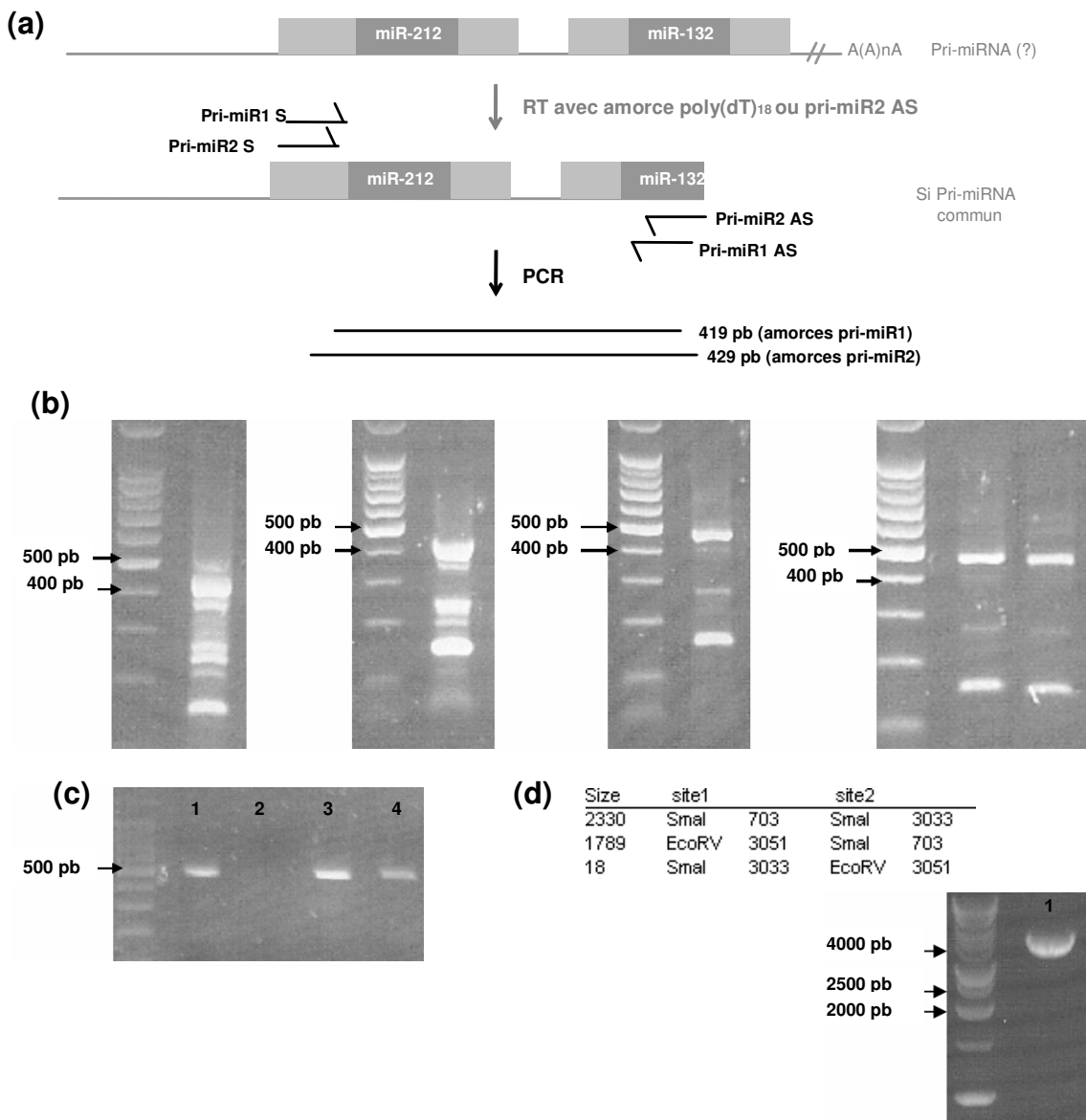


Figure 3.3 : Optimisation de l'amplification d'une région du pri-miR-132/212 et restriction diagnostique d'un amplicon de taille attendue. (a) Stratégie initialement suivie afin de déterminer si les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique. Des extraits d'ARN de cellules stimulées au LPS sont rétro-transcrits avec une amorce poly(dT)₁₈ ou avec une amorce spécifique (pri-miR2AS) s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132. Le cDNA est ensuite utilisé comme matrice afin d'amplifier une portion du pri-miRNA putatif (deux couples d'amorces différents ont été testés : pri-miR1 et pri-miR2, voir Matériel et méthodes, table 2.19). Des produits de 419 ou 429 pb (suivant le couple d'amorces choisis) sont attendus si les miR-132 et miR-212 sont exprimés à partir d'un seul transcrit primaire. Les boîtes gris foncé représentent les séquences des miRNAs matures, tandis que les boîtes gris clair représentent les régions des pre-miRNAs. (b) Optimisation progressive des conditions de RT (rétro-transcription) et de PCR afin d'amplifier le pri-miR-132/212 putatif. *Premier gel* – RT : amorces pri-miR2AS ; dénaturation 10 min à 65°C ; élongation 30 min à 55°C – PCR : amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 1 µM ; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/10 ; température d'hybridation des amorces 50°C. *Second gel* – RT : amorces pri-miR2AS ; dénaturation 5 min à 95°C ; élongation 30 min à 65°C – PCR : amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 1 µM ; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50 ; température d'hybridation des amorces 55°C. *Troisième gel* – RT : amorces pri-miR2AS ; dénaturation 5 min à 95°C ; élongation 30 min à 65°C – PCR : amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 0,2 µM ; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50 ; température d'hybridation des amorces 55°C. *Quatrième gel* – RT : amorces pri-miR2AS ; dénaturation 5 min à 95°C ; élongation 30 min à 65°C – PCR : amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 0,1 µM ; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50 ; température d'hybridation des amorces 62°C (première piste) ou 66,2°C (seconde piste). (c) Le produit PCR de taille comprise entre 400 et 500 pb obtenu dans la dernière condition a été purifié sur gel, ré-amplifié par PCR en utilisant les mêmes conditions (piste 1 ; la piste 2 représente un contrôle sans ADN matrice), re-purifié (piste 3) et digéré avec l'enzyme de restriction SmaI (piste 4). (d) Contrôle positif de digestion SmaI. Le plasmide pSKoriTKan a été digéré par l'enzyme EcoRV (piste 1), purifié en utilisant la même procédure que pour le produit PCR et ensuite digéré par l'enzyme SmaI (piste 2). Les longueurs des fragments attendus suite à cette double digestion ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE.

rapporté que l'induction du miR-155 en réponse à une stimulation au LPS de macrophages murins RAW 264.7 et de macrophages murins primaires dérivés de la moelle osseuse dépendait de la protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein), une protéine liant la boucle terminale des pre-miR-155 et favorisant de cette façon leur maturation (Ruggiero et al., 2009). Cependant, les mêmes auteurs ont remarqué que dans un autre type cellulaire (lymphocytes B humains du centre germinatif), la stimulation au LPS activait la transcription du miR-155 sans en affecter la maturation. Ceci démontre que les mécanismes de contrôle de l'expression des miRNAs dépendent à la fois des stimuli et des types cellulaires étudiés. Dès lors, nous avons voulu nous assurer que les miR-132 et miR-212 sont bien induits suite à un contrôle transcriptionnel dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Pour cela, nous avons tout d'abord démontré que ces deux miRNAs sont transcrits sous forme d'un seul et même pri-miRNA chez l'homme, puis avons quantifié l'expression de cette forme primaire par PCR en temps réel dans des monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. En outre, nous avons étudié l'expression de cette forme primaire, ainsi que celle des formes matures, dans des cellules pré-incubées avec de l'actinomycine D, une molécule inhibant les processus transcriptionnels.

II. Etude de l'expression du pri-miR-132/212

II.1. *Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme*

Comme en témoigne la figure 3.1a, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'induction similaires dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Il se pourrait donc que ces miRNAs soient maturés à partir d'une même forme primaire, comme cela a été démontré chez la souris (Fiedler et al., 2008). De plus, plusieurs analyses bioinformatiques localisent une même région promotrice putative pour les miR-132 et miR-212 humains, ce qui renforce cette hypothèse (Marson et al., 2008, Wang et al., 2010). Afin de déterminer si les miR-132 et miR-212 sont transcrits simultanément dans les cellules humaines, nous avons recherché la présence d'un pri-miRNA polycistronique dans des monocytes THP-1 stimulés pendant 2h à 3h au LPS. Ce temps de stimulation a été choisi sur base de différentes études rapportant que l'induction de la forme primaire du miR-132 a lieu 2 à 4h avant l'induction de la forme mature (Wibrand et al., 2010, Wayman et al., 2008, Fiedler et al., 2008) ; or, le pic d'expression des miR-132 et miR-212 est observé après 6h de stimulation au LPS dans les monocytes THP-1.

Les ARN ont été extraits suivant trois protocoles différents avant d'être rétro-transcrits et utilisés comme matrice afin d'amplifier par PCR, avec différents couples d'amorces, la région de 429 ou 419 pb représentée à la figure 3.3a (voir aussi Matériel et méthodes, point IV). Nous avons modifié de nombreux paramètres au niveau des étapes d'extraction d'ARN, de rétro-transcription et d'amplification par PCR afin d'amplifier un fragment d'ADN de taille attendue (figure 3.3b). Ce fragment a été purifié sur gel et soumis à une restriction diagnostique (figure 3.3c) afin de vérifier s'il s'agissait bien du produit attendu. Cependant, il s'est avéré que le produit obtenu était différent de la région du pri-miRNA que nous désirions amplifier (figures 3.3c et d).

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que les étapes de rétro-transcription et d'amplification PCR pourraient être rendues difficiles suite à la nature de la séquence,

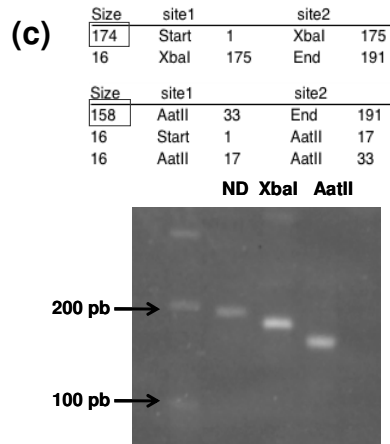


Figure 3.4 : Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme. (a) Stratégie suivie pour démontrer que les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique. Des extraits d'ARN de monocytes THP-1 sont rétro-transcrits avec une amorce spécifique s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132 et utilisés comme matrice afin d'amplifier une région du pri-miRNA située en amont du pre-miR-212. Un produit de 190 pb ne peut être observé que si les miR-132 et miR-212 sont transcrits simultanément étant donné l'utilisation d'une amorce spécifique pour la RT. Les boîtes gris foncé représentent les séquences des miRNAs matures, tandis que les boîtes gris clair représentent les régions des pre-miRNAs. (b) Un fragment de taille attendue (190 pb) est obtenu aussi bien à partir d'extraits d'ARN de monocytes stimulés 2h ou 3h au LPS ou non stimulés et lorsqu'ils sont rétro-transcrits avec une amorce spécifique ou une amorce poly(dT). Les conditions de RT et de PCR utilisées sont les suivantes : RT – 1% DMSO, 0,1 M bêtaïne, amorces pri-miR2 AS 2 μ M ou poly(dT) 2,5 μ M, dénaturation 10 min à 65°C et élongation 30 min à 65°C PCR – 1% DMSO, 0,125 M bêtaïne, amorces pri-miR amont S et AS 1 μ M, produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50. (c) Restriction diagnostique des produits de 190 pb. Après avoir été purifiés, ces produits ont été digérés par les enzymes XbaI ou AatII ou non digérés (ND). Les longueurs des fragments attendus suite à ces digestions ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE.

extrêmement riche en GC (79%) et comportant de plus les hairpins des pre-miR-132 et pre-miR-212. Ces structures secondaires pourraient, à cause du contenu élevé en GC, être particulièrement difficiles à dénaturer et dès lors gêner la rétro-transcription et/ou l'hybridation des amorces lors de la réaction PCR. Nous avons donc employé de la bétaine et du DMSO à différentes concentrations à la fois lors des réactions de rétro-transcription et de PCR, ces additifs étant reconnus pour améliorer le rendement, la spécificité et la reproductibilité des rétro-transcriptions et amplifications des régions riches en GC (Henke et al., 1997, Sahdev et al., 2007). Ces optimisations ne nous ont cependant pas permis d'amplifier la région du pri-miR illustrée à la figure 3.3a (données non montrées).

En émettant l'hypothèse que la réaction PCR pourrait être gênée par la présence des hairpins ou le contenu en GC important situé au niveau des pre-miR-132 et pre-miR-212, nous avons voulu amplifier une autre région du pri-miRNA, située en amont du pre-miR-212 (figure 3.4a). En utilisant comme ADN matrice des extraits d'ARN rétro-transcrits à l'aide d'une amorce spécifique s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132, l'amplification d'une telle région n'est possible que si les deux miRNAs sont transcrits simultanément. Or, comme l'illustre la figure 3.4b (piste 1), un produit de taille attendue a été obtenu. Afin de nous assurer que ce fragment ne résultait pas de l'amplification d'ADN génomique contaminant, les extraits d'ARN ont été, préalablement à leur rétro-transcription, traités à la DNase, sans que cela n'affecte le résultat de la PCR (figure 3.4b, pistes 2, 3 et 4). De plus, deux restrictions diagnostiques ont permis de confirmer l'identité de ce fragment (figure 3.4c), nous permettant de démontrer pour la première fois chez l'homme l'existence d'un pri-miRNA commun aux miR-132 et miR-212.

Il est intéressant de remarquer que l'intensité du fragment amplifié à partir d'extraits de cellules stimulées au LPS (figure 3.4b, piste 3) est plus forte que celle du fragment amplifié à partir d'extraits de cellules non stimulées (figure 3.4b, piste 2). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une PCR quantitative, ces résultats suggèrent que le pri-miR-132/212 pourrait être plus exprimé dans les cellules stimulées au LPS que dans les cellules contrôles. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle les miR-132 et miR-212 seraient induits par le LPS - au moins en partie - suite à des mécanismes transcriptionnels. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons voulu quantifier l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord assurés qu'il était possible de rétro-transcrire ce pri-miR-132/212 à l'aide d'une amorce poly(dT) (figure 3.4b, piste 4). Nous avons ensuite analysé l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel à l'aide d'amorces s'hybridant en dehors des régions des pre-miRNAs (TaqMan® Pri-miRNA Assays, Applied Biosystems).

II.2. Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel

Comme l'illustre la figure 3.5a, deux types d'amorces sont commercialisés par Applied Biosystems pour l'étude de l'expression du pri-miR-132/212. Néanmoins, ces amorces ne sont pas validées et se trouvent chacune environ 500 pb en amont (miR-212) ou en aval (miR-132) des pre-miRNAs. Ces deux amorces sont donc susceptibles de ne pas être fonctionnelles, l'une pouvant être située en amont du site d'initiation de la transcription, l'autre pouvant se trouver en aval du signal pour la queue polyA. Nous avons donc testé la validité de ces deux amorces dans l'étude de l'expression du pri-miR-132/212. Les figures 3.5b et 3.5c illustrent les résultats de la quantification par PCR en temps réel de l'expression relative du pri-miR-

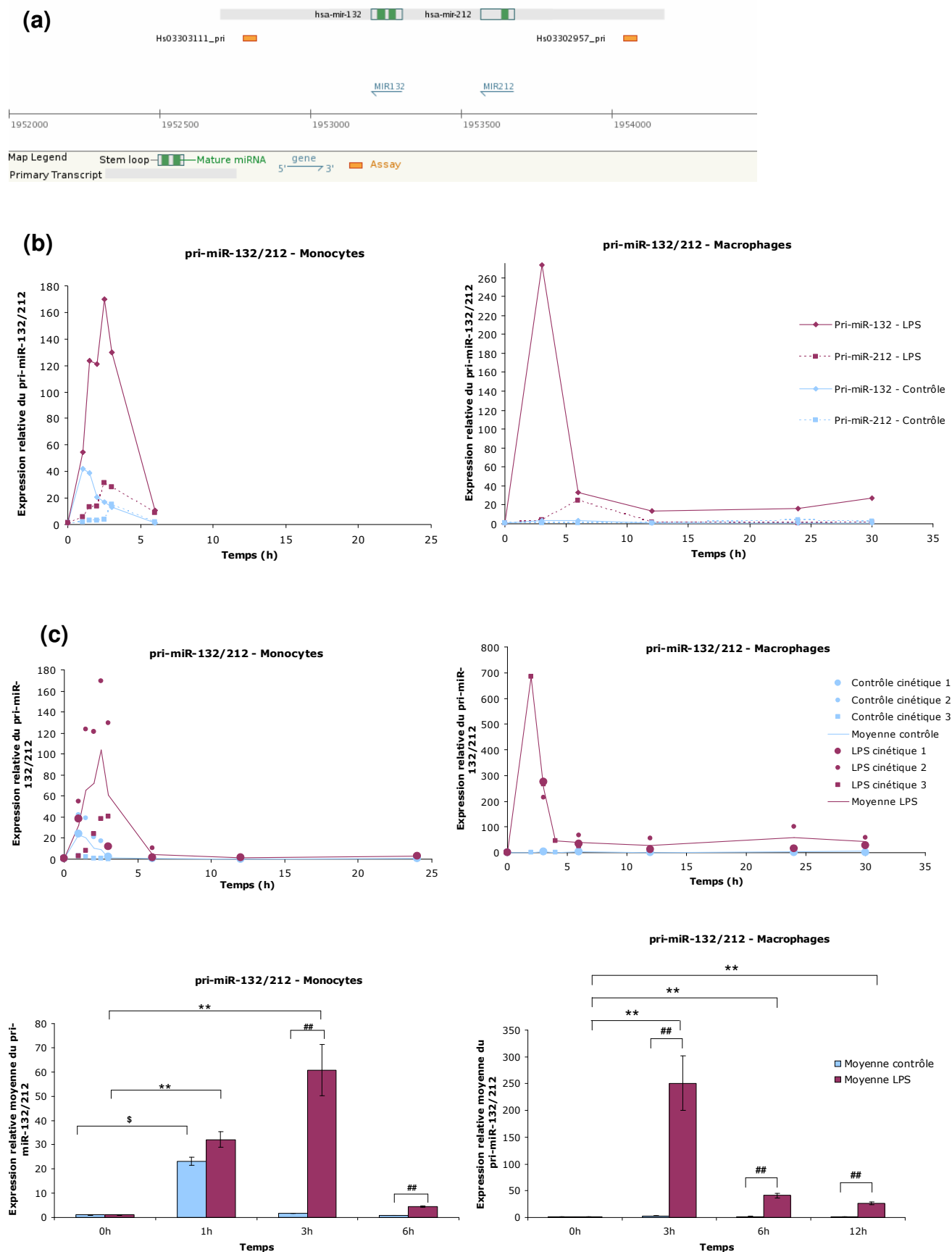


Figure 3.5 : Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel. (a) Positionnement des sondes et amorces utilisées pour la quantification de l'expression du pri-miR-132/212 (TaqMan® Pri-miRNA Assays, Applied Biosystems). (b et c) Des monocytes ou macrophages ont été stimulés avec 1 µg/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance du pri-miR-132/212, normalisée par celle de la GAPDH est exprimée de façon relative au temps 0. (b) Etude de l'expression du pri-miR-132/212 en utilisant les sondes pri-miR-132 et pri-miR-212. (c) Au dessus : expression relative du pri-miR-132/212 (sonde pri-miR-132) dans les monocytes et macrophages au cours de trois manipulations indépendantes. Chaque symbole représente l'évolution de l'expression du pri-miRNA au cours d'une expérience tandis que la courbe représente la moyenne de l'expression relative du pri-miRNA. En

132/212 dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés pendant des durées variables au LPS. Il est important de noter que l'expression du pri-miRNA en utilisant la sonde pri-miR-212 n'a pas pu être calculée dans tous les réplicats étant donné que le seuil de fluorescence n'était pas toujours atteint après 40 cycles d'amplification. De plus, les profils obtenus suite à l'utilisation de cette sonde sont très variables entre les réplicats (résultats non montrés) et ne semblent pas cohérents par rapport aux profils d'induction des formes matures, contrairement à ceux obtenus lors de l'utilisation de la sonde pri-miR-132. Nous en avons déduit que la sonde pri-miR-212 n'était pas fonctionnelle et avons donc utilisé la sonde pri-miR-132 pour l'étude de l'expression du pri-miR-132/212.

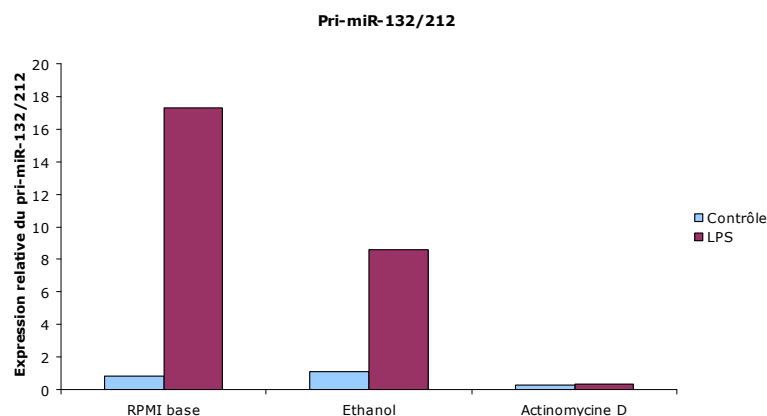
Malgré la variabilité des taux et des cinétiques d'induction observée au sein des différents réplicats (figure 3.5c), dans les monocytes, l'induction du pri-miR-132/212 est déjà très significative après 1h de stimulation au LPS par rapport au temps 0. Cette induction se poursuit jusqu'à 3h de stimulation au LPS pour ensuite rapidement diminuer jusqu'à une expression proche de l'expression basale, après 6h de stimulation. Il est intéressant de noter qu'on observe également une induction significative du pri-miR-132/212 1h après le changement de milieu dans les cellules contrôles. Ceci suggère que l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse à une privation en sérum impliquerait aussi des mécanismes transcriptionnels. Alors que l'expression des miRNAs matures reste assez stable au-delà de 6h de stimulation dans les monocytes (voir figure 3.1), la forme primaire, dont l'induction est très transitoire, est déjà revenue à un niveau quasiment basal après seulement 6h de stimulation. Ces profils d'expression peuvent être expliqués d'une part par une maturation rapide de la forme primaire en formes précurseurs et matures (d'où un retour rapide au niveau d'expression basal) et d'autre part par un temps de demi-vie élevé des miRNAs (Krol et al., 2010) (il est généralement admis que les miRNAs sont des molécules très stables, de temps de demi-vie allant de plusieurs heures à plusieurs jours, ce qui expliquerait la stabilité de leur expression au-delà de 6h de stimulation).

Dans les macrophages, l'induction du pri-miR-132/212 est extrêmement importante et atteint un maximum après 3h de stimulation au LPS. Cette observation conforte les analyses de Fiedler, Wibrand et Wayman chez la souris et le rat, qui avaient observé l'induction du pri-miR-132/212 en moyenne 3h avant l'induction des formes matures (Fiedler et al., 2008, Wibrand et al., 2010, Wayman et al., 2008). Par ailleurs, ces résultats montrent que les cinétiques d'induction du pri-miR-132/212 sont assez similaires à la fois dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS, du moins durant les temps courts de stimulation. Au-delà de 3h de stimulation, l'abondance du pri-miR-132/212 décroît rapidement sans toutefois retourner à un niveau basal comme dans les monocytes et reste plus élevée par rapport au temps 0 ($p < 0,01$) jusqu'à plus de 30h de stimulation, avec éventuellement, selon les réplicats, un second pic d'induction plus faible 24 à 30h après l'initiation de la stimulation. Ceci pourrait expliquer l'induction prolongée des formes matures dans les macrophages. Étant donné qu'il est généralement admis que les formes primaires des miRNAs disposent d'un temps de demi-vie court (Cullen, 2004), le fait que le pri-miR-132/212 soit continuellement surexprimé dans les macrophages stimulés au LPS pourrait indiquer une transcription active et continue durant une longue période dans ces cellules. On ne peut cependant exclure que le pri-miRNA soit stabilisé dans les macrophages.

Par ailleurs, les taux d'induction de la forme primaire sont largement supérieurs à ceux des formes matures. Ces observations suggèrent que certaines étapes de la maturation des miR-132 et miR-212 pourraient être limitantes. Bien que peu de choses soient encore connues à ce sujet, il est intéressant de noter que l'équipe de Wibrand a mesuré l'expression de ces

dessous : histogrammes représentant la moyenne de l'expression relative du pri-miR-132/212 dans les différents réplicats. Les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de ΔCt (voir Matériel et méthodes, point VI). Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de ΔCt (voir Matériel et méthodes, point VI). Les comparaisons intra-LPS sont représentées par des étoiles (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$), les comparaisons intra-contrôles sont représentées par des dollars (\$, $p < 0,05$) et les comparaisons entre les cellules contrôles et stimulées sont représentées par des dièses (#, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$).

(a)



(b)

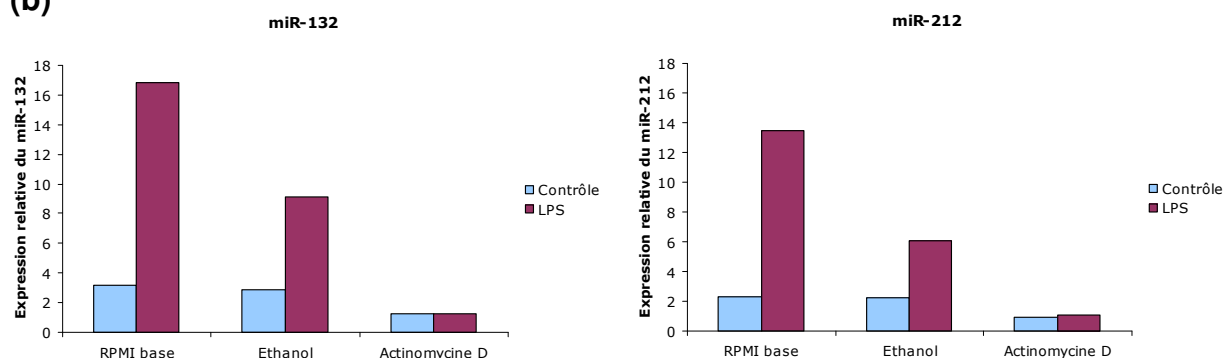


Figure 3.6 : L'induction du pri-miR-132/212 et des miR-132 et miR-212 par le LPS est supprimée en présence d'actinomycine D. Des monocytes ont été pré-incubés pendant 30 min avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D, une concentration correspondante en solvant (éthanol) ou du RPMI base puis stimulés pendant 3h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. L'abondance du pri-miR-132/212 (normalisée à celle de la GAPDH) (a) ainsi que celle des formes matures (normalisée par l'abondance du RNU-44) (b) est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'échantillons biologiques.

miRNAs matures, mais aussi l'expression de leurs formes précurseurs et primaire, lors de la potentialisation à long terme du dentus gyratus de rats. Ces chercheurs ont remarqué que l'induction des formes primaires et précurseurs avait lieu très rapidement, alors que l'induction de la forme mature n'était détectée que 2h plus tard (Wibrand et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les transcrits primaires pourraient être maturés très rapidement, tandis que le transport des précurseurs dans le cytoplasme et/ou la conversion des précurseurs en formes matures serait plus lent(e). Confortant cette hypothèse, il a été démontré par des chercheurs travaillant sur le miR-30a que la surexpression de l'exportine 5 induisait une augmentation de l'expression de la forme mature de ce miRNA ainsi qu'une augmentation de la répression d'une de ses cibles (Yi et al., 2005). Bien que les auteurs n'aient pas identifié d'impact de la surexpression des enzymes Drosha et Dicer, on ne peut exclure que les étapes de maturation dépendantes de ces protéines ne soient limitantes. En effet, Drosha et Dicer requièrent pour leur fonction la présence de plusieurs partenaires protéiques, lesquels pourraient être limitants.

III. Les miR-132 et miR-212 sont transcriptionnellement induits dans les cellules THP-1 stimulées au LPS

Bien que les profils d'induction du pri-miR-132/212 dans les cellules stimulées au LPS suggèrent fortement que l'expression des miR-132 et miR-212 est contrôlée, au moins en partie, au niveau transcriptionnel, nous avons voulu démontrer de façon plus définitive l'implication de la transcription dans l'induction de ces miRNAs. Pour cela, nous avons pré-incubé des monocytes en présence d'actinomycine D, une molécule inhibant la transcription en s'intercalant dans l'ADN et avons ensuite analysé l'expression des formes matures et primaire des miR-132 et miR-212 après 3h de stimulation au LPS.

L'étude de l'expression du pri-miR-132/212 montre que la pré-incubation avec l'actinomycine D abolit complètement l'induction du pri-miRNA observée dans les cellules non pré-incubées (figure 3.6a), démontrant que l'expression du pri-miR-132/212 est transcriptionnellement induite lors d'une stimulation au LPS. Des profils d'expression tout à fait similaires sont observés pour les formes matures (figure 3.6b). Il est intéressant de remarquer que l'induction des miRNAs dans les cellules contrôles (résultant probablement de la privation en sérum, comme décrit au point I) est également réprimée en présence d'actinomycine D, ce qui renforce l'hypothèse précédemment énoncée selon laquelle les miR-132 et miR-212 seraient aussi induits transcriptionnellement dans les monocytes privés en sérum.

Etant donné que l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS est induite par des mécanismes transcriptionnels, nous nous sommes intéressés aux facteurs de transcription susceptibles de contrôler l'expression de ces miRNAs.

IV. Les rôles d'AP-1, NF- κ B et CREB dans l'expression des miR-132 et miR-212

La régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 est encore peu connue actuellement. Deux équipes (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005) ont démontré que le facteur de transcription CREB participait à l'induction du pri-miR-132/212 dans les neurones corticaux

de rats et de souris stimulés par des neurotrophines ; cependant, aucun autre facteur de transcription régulant l'expression de ces miRNAs n'a encore été mis en évidence. De plus, la question de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 n'a pas encore été posée dans des contextes autres que neuronaux. Afin de déterminer quels facteurs de transcription candidats pourraient se révéler intéressants dans le cadre d'une stimulation au LPS de cellules monocytaires, nous avons analysé la séquence d'ADN localisée en amont des gènes encodant les miR-132 et miR-212 humains de façon à localiser des séquences de liaison pour des facteurs de transcription.

IV.1. Analyse bioinformatique de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212

L'analyse bioinformatique réalisée à l'aide du logiciel Transfac (Biobase) et présentée en annexe 1 illustre les sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription détectés dans la région génomique s'étendant de 5000 pb en amont du pre-miR-212 à l'extrémité aval du pre-miR-132 (longueur totale : 5473 pb). En sélectionnant la matrice « vertébrés non-redondants » et l'option minimisant les faux positifs, 279 sites putatifs sont détectés dans cette séquence. Il est intéressant de noter que ces sites de liaison sont répartis de part et d'autre d'une région de séquences répétées au sein de laquelle aucun site putatif n'était détecté lors des analyses réalisées au début de la recherche. Parmi ces 279 sites putatifs sont inclus 18 sites de liaison putatifs pour le facteur de transcription CREB. Etant donné que certains sites détectés se chevauchent de quelques nucléotides, ces 18 sites se regroupent en réalité en 10 sites distincts les uns des autres. Deux sites AP-1 distincts sont également détectés en utilisant cette matrice. Lorsque l'analyse est effectuée en sélectionnant une matrice spécifique des cellules immunes (option minimisant les faux positifs), 156 sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription sont détectés, dont 28 pour AP-1 se regroupant en 7 sites distincts. En outre, 4 sites putatifs regroupés en deux localisations sont également détectés pour le facteur de transcription NF- κ B. Bien que moins de sites aient été identifiés pour ce facteur, son rôle pourrait tout de même être important dans l'expression des miR-132 et miR-212 étant donné qu'il est requis pour l'expression de la plupart, sinon de tous les gènes induits par le LPS dans les monocytes humains (Guha and Mackman, 2001).

Les facteurs de transcription CREB, AP-1 et NF- κ B sont connus pour être activés en réponse au LPS (voir Introduction, point III.2.c) et pour induire la transcription de gènes encodant des médiateurs inflammatoires. Aurélie Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a d'ailleurs vérifié que l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription était augmentée lors de la stimulation au LPS de cellules THP-1. Nous avons donc entrepris l'étude du rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212 par le LPS.

IV.2. Inhibition du facteur de transcription AP-1

Afin d'étudier le rôle potentiel d'AP-1 dans la transcription des miR-132 et miR-212, nous avons pré-incubé des macrophages pendant 30 min avec un inhibiteur de JNK, le SP 600125, avant de les stimuler au LPS. Il a été rapporté que cet inhibiteur inhibait les JNK1, JNK2 et JNK3 et que l'incubation de cellules en sa présence résultait en une inhibition concentration-dépendante de la phosphorylation de c-Jun et de l'expression de gènes inflammatoires. En

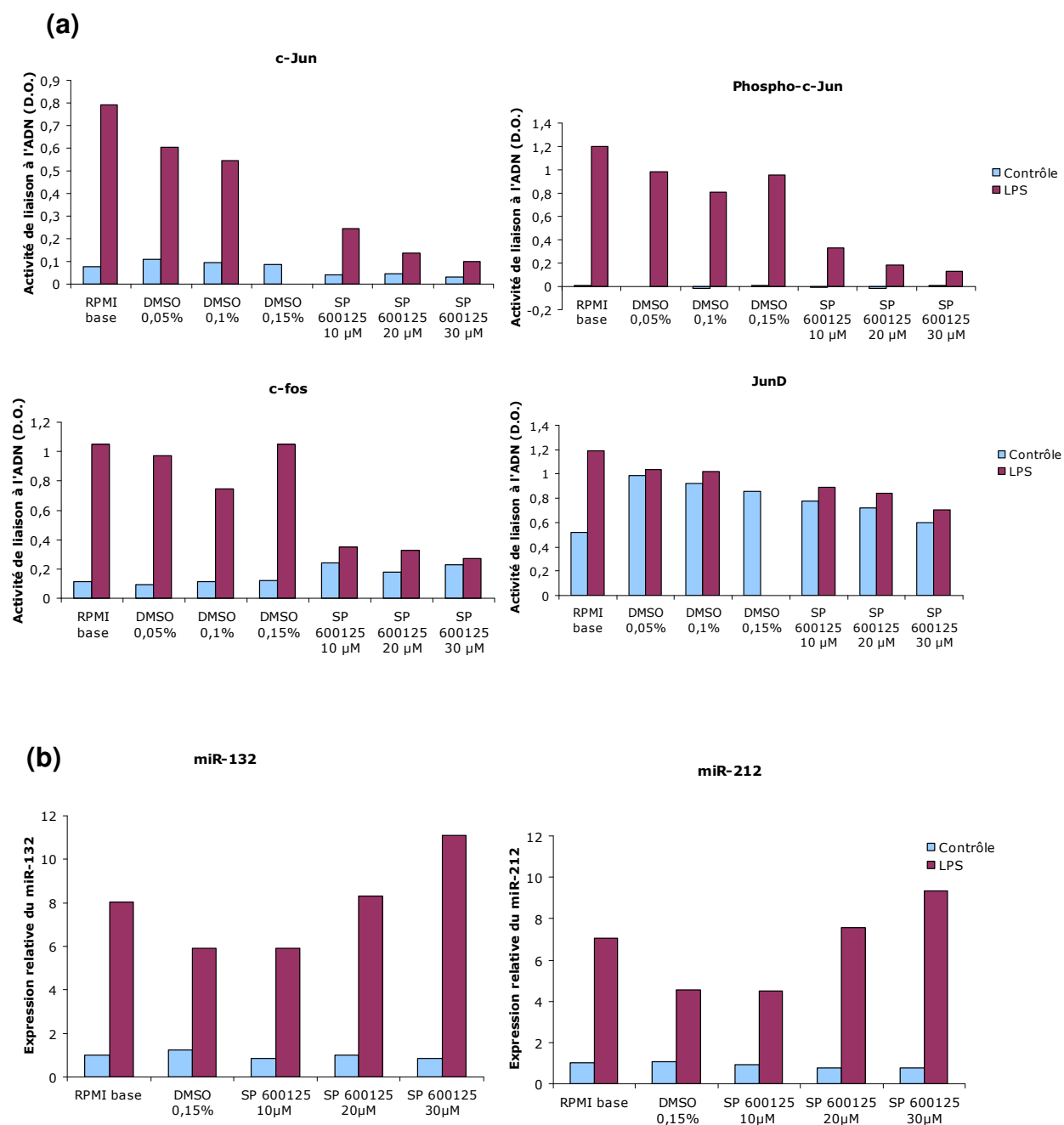


Figure 3.7 : Effets du SP 600125 sur l'activité de liaison à l'ADN de différents membres de la famille AP-1 (a) et sur l'expression des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été pré-incubés pendant 30 min avec l'inhibiteur de JNK SP 600125 ou son solvant (DMSO) aux concentrations indiquées (les concentrations en DMSO correspondent à celles utilisées lors des pré-incubations en présence de SP 600125) puis stimulés avec 1 µg/ml de LPS. (a) Après 45 min de stimulation, les protéines nucléaires ont été extraites et les activités de liaison à l'ADN de c-Jun, phospho-c-Jun, c-Fos et JunD ont été évaluées (les extraits protéiques nucléaires de la condition DMSO 0,15% + stimulation LPS n'étaient pas suffisants que pour permettre l'analyse de la liaison à l'ADN des membres c-Jun et JunD). (b) Après 24h de stimulation, les ARN ont été extraits et utilisés pour quantifier l'abondance des miR-132 et miR-212. Les résultats (normalisés par l'abondance du RNU-44) sont exprimés de façon relative aux cellules contrôles pré-incubées dans du RPMI base. Les données représentent la moyenne de 2 mesures (en TransAM (a) ou PCR en temps réel (b)) réalisées à partir d'une série d'échantillons biologiques.

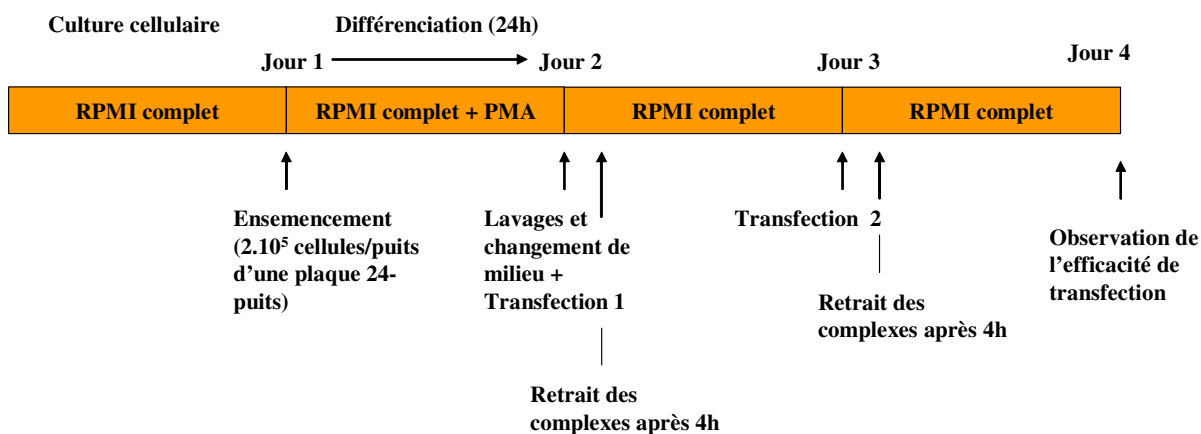
outre, cet inhibiteur bloque l'induction de l'expression du TNF- α observée *in vivo* en réponse au LPS dans des modèles murins (Bennett et al., 2001).

Nous avons tout d'abord démontré que cet inhibiteur empêchait l'activation d'AP-1 en analysant l'activité de liaison à l'ADN de trois membres de la famille AP-1 (c-Fos, c-Jun et sa forme phosphorylée, et JunD) après 45 min de stimulation au LPS. Les résultats illustrés à la figure 3.7a montrent que le SP 600125 inhibe efficacement l'activité de liaison à l'ADN de c-Fos, c-Jun et phospho-c-Jun, mais pas celle de JunD. Cependant, il est intéressant de noter que parmi les membres testés, JunD est celui dont l'activité de liaison à l'ADN est la moins augmentée suite à la stimulation au LPS. Etant donné que le SP 600125 inhibe efficacement les deux membres de la famille AP-1 qui sont le plus activés par le LPS, nous avons évalué l'effet de cet inhibiteur sur l'expression des miR-132 et miR-212. La figure 3.7b montre que la concentration en DMSO correspondant à la plus forte concentration en SP 600125 utilisée provoque une diminution d'environ 30% de l'induction des miR-132 et miR-212 par le LPS. Cependant, contre toute attente, nous avons remarqué que l'incubation des cellules en présence de SP 600125 provoque une augmentation de l'induction des miR-132 et miR-212 observée en réponse au LPS et ce, d'une façon dépendante de sa concentration.

Initialement, nous avons proposé trois hypothèses pour expliquer ces résultats inattendus (voir document sur l'état d'avancement du mémoire rédigé en juin 2010). Premièrement, nous pensions que la pré-incubation réalisée pourrait ne pas être suffisante pour inhiber AP-1 à long terme (24h). Deuxièmement, nous avons émis l'hypothèse qu'AP-1 pourrait ne pas intervenir de façon directe dans l'expression des miR-132 et miR-212 mais plutôt influencer indirectement leur expression en contrôlant celle d'un répresseur transcriptionnel. Enfin, nous avons suggéré que le SP 600125 pourrait induire des réponses cellulaires aspécifiques conduisant à l'activation de la transcription des miR-132 et miR-212. Il a d'ailleurs été rapporté à plusieurs reprises que cet inhibiteur de JNK exerçait des activités non spécifiques. En effet, le SP 600125 inhibe la phosphorylation stimulée par l'insuline d'un résidu thréonine d'Akt ainsi que celle des résidus tyrosines d'IRS-1 (insulin receptor substrate 1) et du récepteur à l'insuline (Jiang et al., 2003). D'autres auteurs ont rapporté que le SP 600125 inhibait l'activité de 13 autres kinases au moins autant, voire davantage, que l'activité des JNK (Bain et al., 2003). De plus, une analyse transcriptomique récente a mis en évidence que le SP 600125 modulait, outre la voie des JNK, celles de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) ainsi que la voie des MAPK ERK (Champelovier et al., 2010). Ces résultats montrent que cet inhibiteur de JNK n'agit pas de façon spécifique, contrairement à ce qui avait été rapporté initialement, et qu'il serait opportun de développer d'autres inhibiteurs plus sélectifs afin d'étudier le rôle des JNK dans divers processus cellulaires (Bain et al., 2003).

Par ailleurs, il a également été démontré dans une lignée monocyttaire humaine (U937) que lorsqu'on inhibait une voie de MAPK, les deux autres pouvaient s'activer en compensation. Les mécanismes responsables de ce phénomène sont encore inconnus, mais feraient probablement intervenir des boucles de rétro-action positives ou négatives étant donné la rapidité avec laquelle ces mécanismes de compensation sont activés. En effet, Espelin *et al.* ont remarqué que les voies ERK1/2 et p38 s'activaient en réponse à un inhibiteur de JNK (Calbiochem VIII) et qu'inversement, les voies JNK et ERK étaient activées en présence d'un inhibiteur de MAPK p38. Ces observations confirment que les voies de MAPK sont interconnectées et que des réponses cellulaires de compensation peuvent être activées afin de contourner les effets d'un inhibiteur (Espelin et al., 2010). Nous avons donc émis l'hypothèse que le SP 600125 pourrait, en inhibant la voie des JNK, activer indirectement les voies p38 et ERK. Or, le facteur de transcription CREB, dont le rôle dans la transcription des miR-132 et

(a)



(b)

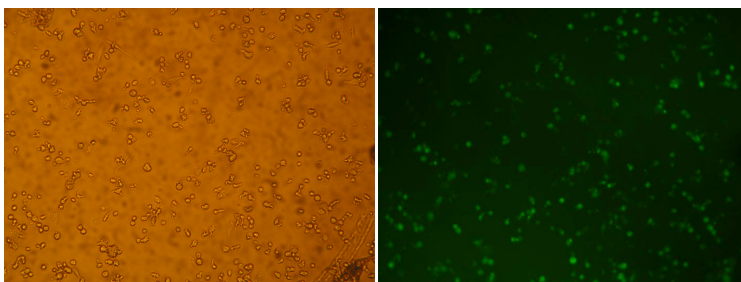


Figure 3.8 : Mise au point des conditions de transfection des macrophages THP-1 par des siRNA. Le protocole utilisé est le résultat des mises au point résumées à la table 2.4 (Matériel et méthodes, point I.4.b). (a) Chronologie des manipulations réalisées lors de la transfection de siGLO® dans les macrophages. (b) Visualisation de l'efficacité de transfection suite à une double transfection en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X. L'efficacité de transfection (~90%) a été déterminée en divisant le nombre de cellules transfectées, apparaissant vertes en microscopie à fluorescence (à droite), par le nombre total de cellules observées en microscopie à fond clair (à gauche).

miR-212 a déjà été démontré (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005), est activé en aval de ces voies via la phosphorylation de MSK1 (voir Introduction, point III.2.b et c). Une activation de CREB indirectement provoquée par le SP 600125 pourrait expliquer l'augmentation de l'expression des miR-132 et miR-212 en présence de cet inhibiteur, malgré que celui-ci inhibe efficacement l'activité de liaison à l'ADN de plusieurs membres de la famille AP-1. Renforçant cette hypothèse, il a été démontré que le SP 600125 induisait une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription CREB après seulement 5 min et durant plus de 2h dans une lignée de cellules bêta murines (MIN6), sans que son abondance totale ne soit modifiée (Vaishnav et al., 2003). Les auteurs ont démontré que la phosphorylation de CREB induite par le SP 600125 dépendait en partie de la voie MAPK p38 et de la kinase MSK1. Cependant, la présence d'un inhibiteur de MAPK p38 ne réprimant pas totalement les effets positifs du SP 600125 sur la phosphorylation de CREB, il se pourrait que dans ce cas également l'inhibiteur de JNK active la voie ERK, qui participe aussi à la phosphorylation du facteur CREB. Il serait donc intéressant, afin de soutenir le rôle de CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 dans les macrophages THP-1 pré-incubés avec l'inhibiteur de JNK, d'étudier l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription en présence de SP 600125.

Etant donné les effets aspécifiques exercés par le SP 600125, nous ne pouvons pas tirer de conclusions quant au rôle éventuel que pourrait jouer AP-1 dans l'expression des miR-132 et miR-212. Il serait donc nécessaire de mettre en place des stratégies plus spécifiques, telles que la transfection de siRNA ou de plasmides encodant des dominants négatifs de membres de la famille AP-1 afin de déterminer si ce facteur de transcription semble requis pour l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées par du LPS. Ce point sera discuté plus en détails dans la partie « Conclusions et perspectives » de ce mémoire.

IV.3. Répression de CREB et p65

Afin d'étudier les rôles putatifs de CREB et NF- κ B dans la transcription des miR-132 et miR-212 d'une façon plus spécifique que par l'intermédiaire d'inhibiteurs chimiques, nous avons transfecté des cellules THP-1 avec des siRNA spécifiques de CREB et de p65 (encore appelée RelA), la sous-unité transactivatrice de NF- κ B la plus fréquemment activée.

IV.3.a.Optimisations de transfection de siRNA

Les cellules THP-1 étant difficiles à transfecter, la première étape afin de réprimer l'expression de p65 et de CREB par siRNA consistait en l'optimisation des conditions de transfection. Nous avons testé l'efficacité de quatre agents de transfection à différentes concentrations, dans différentes conditions de culture cellulaire (densité des cellules, différenciation avant ou après la transfection) ainsi que des transfections simples ou successives, deux jours de suite. Les taux de transfection approximatifs obtenus dans ces différentes conditions sont résumés à la table 2.4 (Matériel et méthodes, point I.4.b). Parmi les conditions testées, les meilleurs taux de transfection ont été obtenus suite à deux transfections successives en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X (figure 3.8).

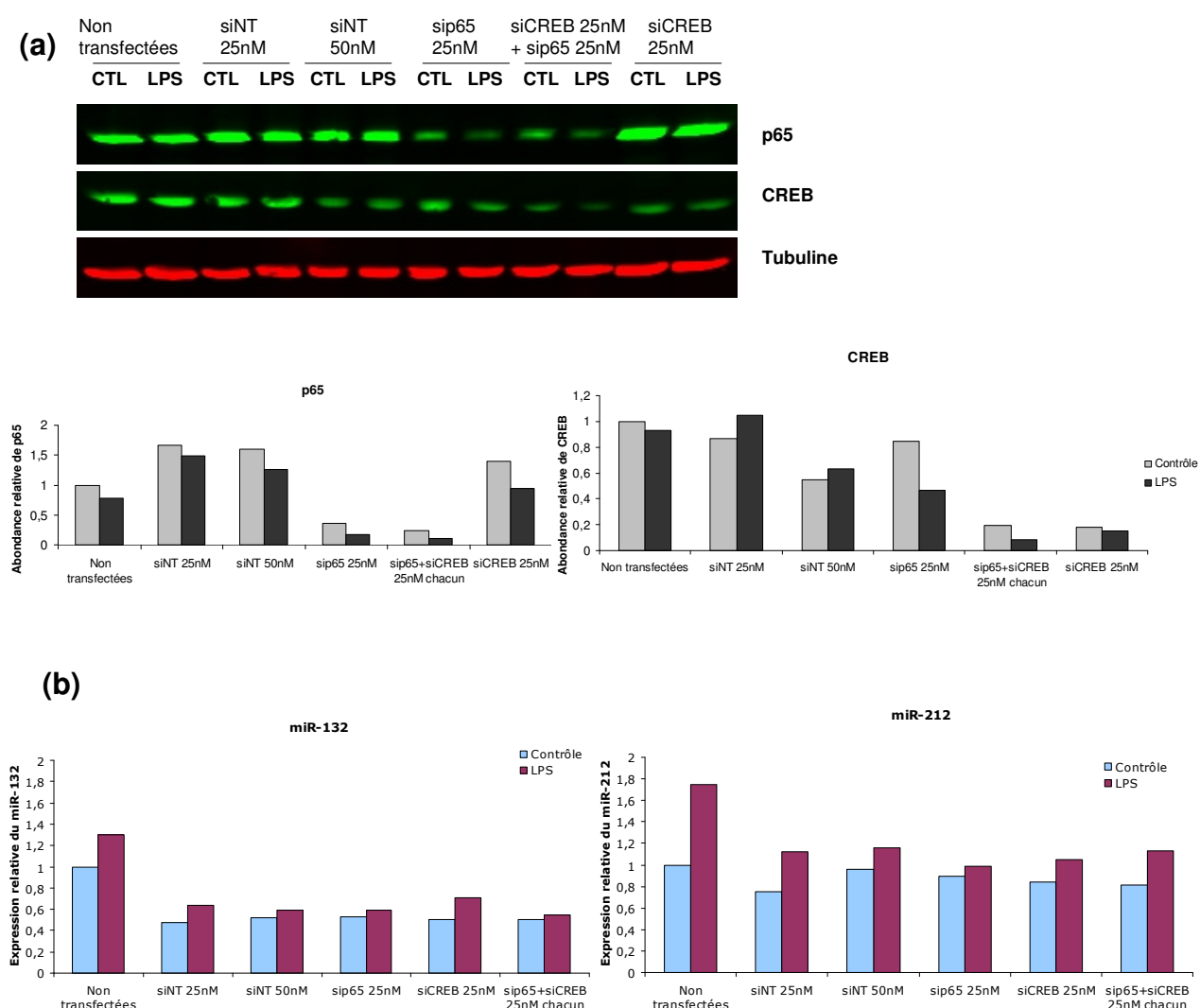


Figure 3.9 : Effets de la transfection de siRNA spécifiquement dirigés contre p65 et CREB dans des macrophages THP-1 sur l'abondance de ces protéines (a) et sur l'expression des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été transfectés deux jours successifs avec des siRNA non target (« siNT »), spécifiquement dirigés contre p65 (« sip65 ») et/ou contre CREB (« siCREB ») aux concentrations indiquées. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 6h au LPS avant que les protéines totales et les ARN ne soient extraits. (a) Détermination de l'abondance des protéines p65 et CREB par Western Blot. Les graphes présentent la quantification des abondances de p65 et CREB normalisées à celle de l' α -tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimées de façon relative aux cellules non transfectées contrôles. (b) L'abondance des miR-132 et miR-212, normalisée par celle du RNU-44 est également exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. Ces résultats représentent la moyenne de deux mesures en PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'extraits biologiques.

IV.3.b. Transfection de siRNA contre CREB et p65

Afin de diminuer l'abondance de CREB et de p65, nous avons transfecté des macrophages THP-1 deux jours de suite avec des siRNA spécifiquement dirigés contre CREB (« siCREB ») et/ou contre p65 (« sip65 ») à une concentration de 25 nM et avons ensuite stimulé ces cellules au LPS (voir figure 2.2 dans le Matériel et méthodes). Comme l'illustre la figure 3.9a, la transfection de sip65 25 nM engendre une diminution de l'abondance de p65 de 78 à 88 % (cellules contrôles et stimulées au LPS, respectivement) par rapport aux cellules transfectées par une concentration identique en siRNA « non-target » (« siNT »). Il est assez surprenant d'observer que la transfection de ces sip65 est également associée, pour une raison inconnue, à une diminution de l'abondance de CREB dans les cellules stimulées au LPS. Il serait intéressant de reproduire cette manipulation afin de déterminer si ce phénomène se vérifie. La transfection de siCREB 25 nM induit quant à elle une diminution de 79 à 85% de l'abondance de CREB par rapport aux cellules transfectées par une quantité identique de siNT. Afin de tester l'influence de la répression simultanée de CREB et p65, nous avons également transfecté des cellules avec des sip65 et siCREB, chacun présents à une concentration de 25 nM. La figure 3.9a montre que cette double transfection permet de diminuer les abondances de p65 et CREB d'une façon similaire aux simples transfections. Il est à noter cependant que la transfection de siNT à une concentration de 50 nM induit elle-même une légère diminution de l'abondance de CREB.

Après avoir démontré que la transfection de siRNA spécifiques permet de réprimer efficacement l'expression de CREB et p65, nous avons étudié l'effet de ces répressions sur l'expression des miRNAs. La figure 3.9b montre que la transfection de sip65 et siCREB réprime l'expression du miR-132 d'environ 50% à la fois dans les cellules contrôles et stimulées au LPS, ainsi que l'induction du miR-212 en réponse au LPS, mais montre également que la transfection de siNT exerce un effet similaire. Il semble donc que le processus de transfection lui-même réprime l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Il est à noter toutefois qu'au cours de cette manipulation, l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS et non transfectées est assez faible, ce qui rend peu aisée l'analyse de l'effet des répressions de p65 et CREB sur l'induction de ces miRNAs. Cette manipulation a été reproduite en transfectant des concentrations identiques en sip65 et siCREB, ainsi qu'en incubant des cellules avec de la Lipofectamine seule (en concentration identique aux transfections de siRNA), de façon à déterminer si la répression de l'induction des miR-132 et miR-212 est liée à la présence de siNT ou à l'agent transfectant. Comme attendu, la présence de Lipofectamine seule n'affecte pas l'abondance des protéines p65 et CREB (figure 3.10a), tandis que la transfection de siRNA spécifiques permet d'obtenir des taux d'extinction relativement similaires à ceux obtenus lors de la manipulation précédente. En revanche, l'incubation des cellules avec cet agent de transfection seul réprime l'induction des miR-132 et miR-212 observée en réponse au LPS (figure 3.10b) autant que la répression de p65 et CREB, empêchant de mettre en évidence un rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans l'expression des miR-132 et miR-212. Clairement, le processus de double transfection par la Lipofectamine semble modifier la biologie des cellules, rendant toute interprétation de ces résultats hasardeuse.

Il serait peut-être nécessaire, afin d'identifier un rôle putatif de ces facteurs de transcription dans l'induction des miR-132 et miR-212, de réprimer plus efficacement encore leur expression. En effet, il se pourrait que la transfection de siRNA permette de diminuer de façon assez importante l'abondance totale de p65 et CREB, sans affecter fortement l'activité globale de ces facteurs de transcription. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'effet de la

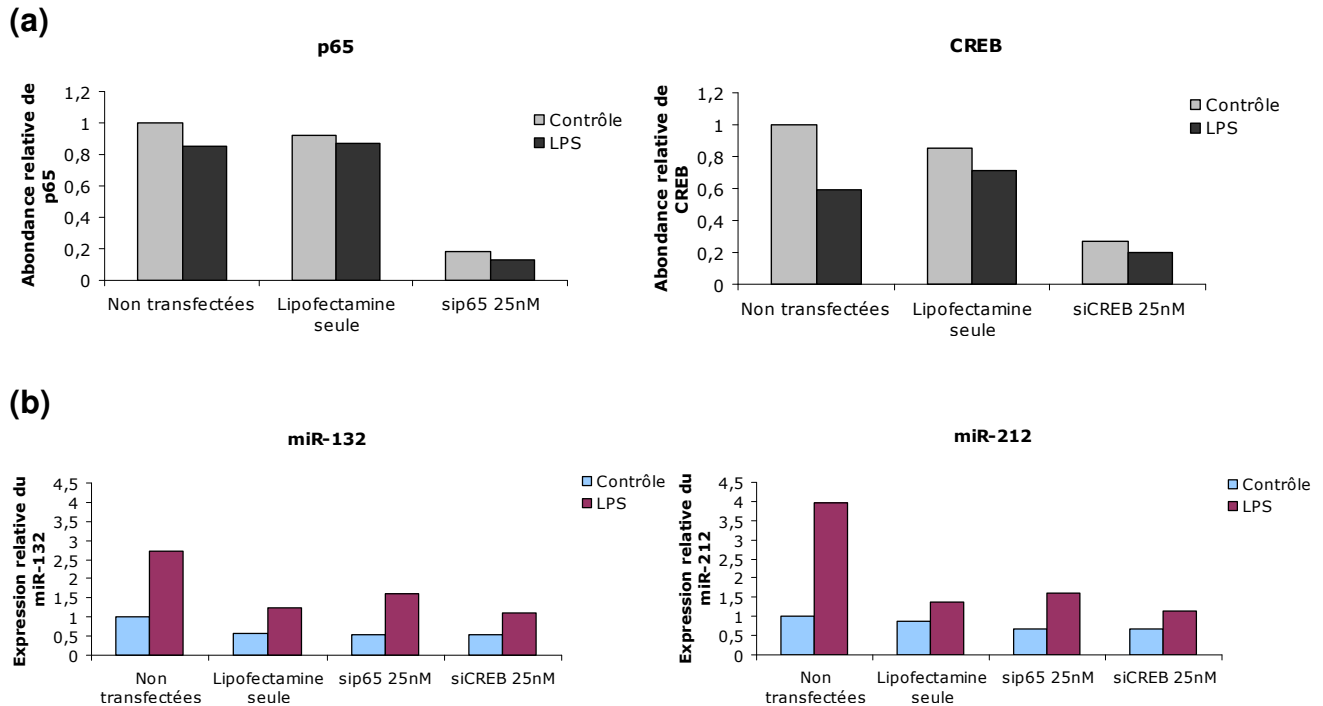


Figure 3.10 : Effets de la lipofectamine et de la transfection de sip65 et siCREB dans des macrophages THP-1 sur l'abondance de p65 et CREB (a) et sur l'expression relative des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été transfectés deux jours successifs avec des siRNA aux concentrations indiquées puis stimulés pendant 6h au LPS avant que les protéines totales et les ARN ne soient extraits. (a) Détermination de l'abondance des protéines p65 et CREB par Western Blot. Les graphes présentent la quantification de l'abondance de p65 et CREB normalisée à celle de l' α -tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. (b) L'abondance des miR-132 et miR-212, normalisée à celle du RNU-44 est également exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. Ces résultats représentent la moyenne de deux mesures en PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'extraits biologiques.

répression de ces facteurs sur leur abondance nucléaire, leurs modifications post-traductionnelles ainsi que leur activité de liaison à l'ADN.

De façon assez surprenante, et comme remarqué lors de la manipulation précédente, la Lipofectamine réprime l'expression basale du miR-132 d'environ 50%, alors qu'elle affecte peu celle du miR-212 (figures 3.9b et 3.10b). En revanche, la présence de cet agent de transfection est corrélée à une forte répression de l'induction du miR-212 en réponse au LPS. Ces résultats nous laissent spéculer que la transfection pourrait affecter la maturation et/ou la stabilité de ces deux miRNAs de façons différentes.

Bien que la répression de CREB ne semble pas réprimer davantage l'expression des miR-132 et miR-212 que l'exposition des cellules à l'agent transfectant seul, nous avons voulu poursuivre nos recherches à propos de ce facteur de transcription. En effet, l'utilisation de SP 600125 induit une augmentation de l'expression de ces miRNAs ; or, bien que les effets du SP 600125 soient non spécifiques, il a été rapporté que cet inhibiteur pourrait être utilisé en tant qu'activateur de CREB (Vaishnav et al., 2003). Nous avons donc voulu déterminer si, de façon inverse, l'incubation de cellules en présence d'inhibiteurs de CREB réprimait l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Bien que nous soyons conscients des difficultés d'interprétations des résultats liées à la non-spécificité des inhibiteurs chimiques, nous avons tout de même choisi de les utiliser dans le but de pouvoir au moins écarter, dans le cas où ces inhibiteurs auraient un effet sur l'activation de CREB mais pas sur l'expression des miR-132 et miR-212, l'hypothèse selon laquelle ce facteur jouerait un rôle majeur dans leur induction en réponse au LPS.

IV.4. Inhibition du facteur de transcription CREB

Afin d'inhiber le facteur de transcription CREB, nous avons pré-incubé des macrophages avec les inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220. Le H-89 est un inhibiteur de PKA (protéine kinase A) qui inhibe avec une efficacité comparable trois autres kinases : S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1), ROCK-II (Rho-associated kinase II) et MSK1 (Davies et al., 2000). Le Ro-31-8220, initialement présenté comme un inhibiteur de PKC (protéine kinase C) inhibe aussi avec une grande efficacité les kinases S6K1, RSK (ribosomal s6 kinase) et MSK1 (Davies et al., 2000). Or, comme cela a été décrit dans l'introduction (points III.2.b et III.2.c), MSK1 phosphoryle CREB en réponse au LPS. Bien que ces deux inhibiteurs inhibent d'autres cibles que MSK1, plusieurs auteurs les ont néanmoins utilisés de façon à réprimer la phosphorylation de CREB. L'équipe de Caivano a notamment démontré que l'incubation de macrophages RAW264 avec du Ro-31-8220 (5 μ M) ou du H-89 (25 μ M) empêchait complètement la phosphorylation de CREB sur son résidu sérine 133 observée en réponse au LPS (Caivano and Cohen, 2000). Nous avons donc employé ces deux inhibiteurs de façon à déterminer si CREB semblait intervenir dans la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Nous avons tout d'abord évalué l'effet de chacun de ces inhibiteurs sur la phosphorylation de CREB après 45 min de stimulation au LPS. Comme l'illustre la figure 3.11a, l'abondance totale de CREB n'est pas modifiée suite à ces traitements, alors que la phosphorylation de CREB est augmentée suite à la stimulation au LPS des cellules non pré-incubées avec les inhibiteurs (pour une raison non connue, cet effet n'est pas visible sur le Western Blot présenté à gauche sur la figure 3.11a dans les cellules pré-incubées dans du RPMI base seul mais a néanmoins été observé dans un réplicat (présenté à droite)). En revanche, l'incubation

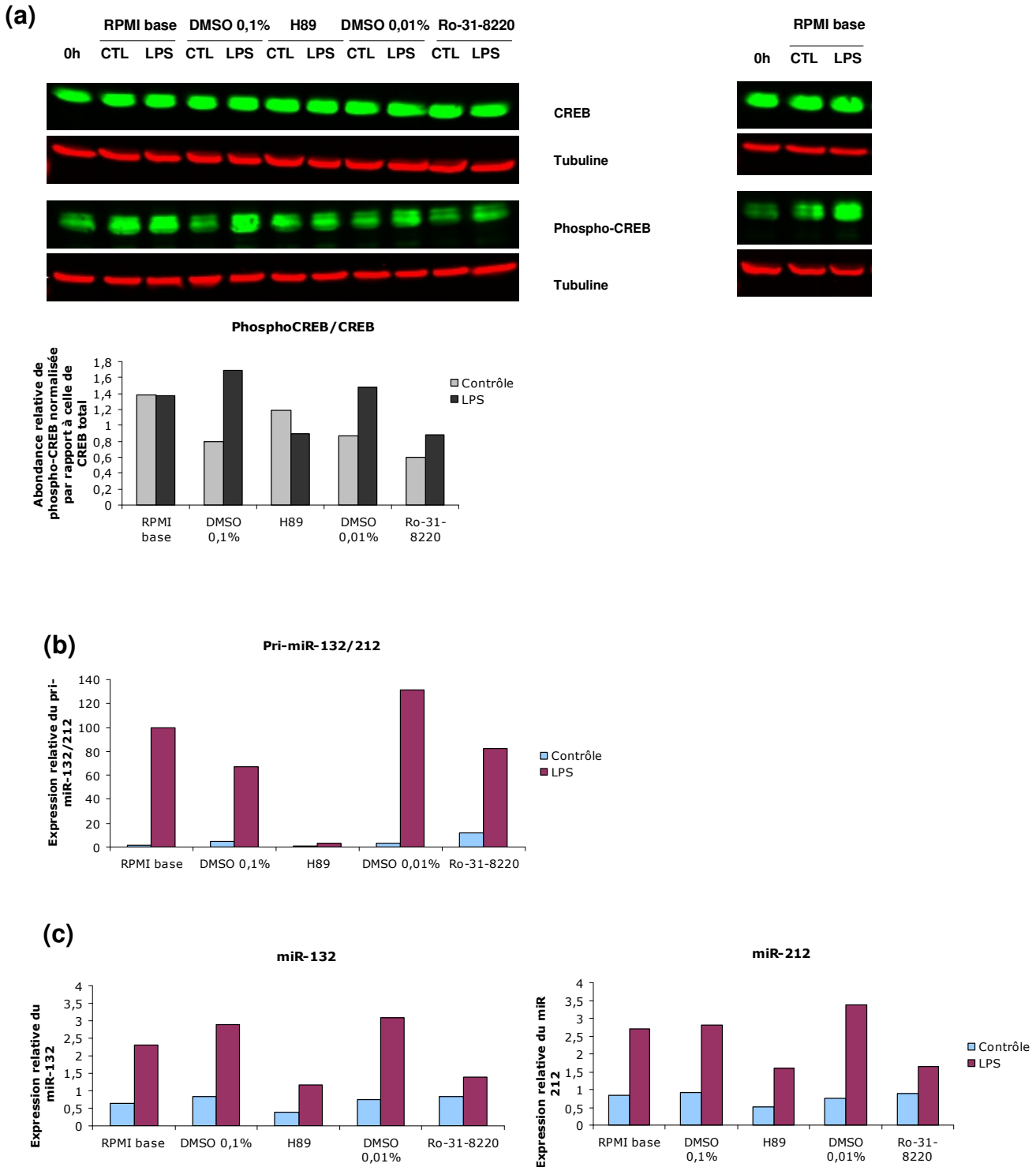


Figure 3.11 : Effets des inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220 sur la phosphorylation de CREB (Ser 133) (a), l'expression du pri-miR-132/212 (b) et des miRNAs matures (c). Des macrophages ont été pré-incubés pendant 1h avec les inhibiteurs H-89 (20 μ M) ou Ro-31-8220 (5 μ M), des concentrations correspondantes en solvant (DMSO 0,1% pour H-89 et DMSO 0,01% pour Ro-31-8220) ou du RPMI base seul. Les macrophages ont ensuite été stimulés pendant 45 min, 6h et 24h au LPS (1 μ g/ml). (a) Détermination de l'abondance de la forme phosphorylée et de la forme totale de CREB par Western Blot après 45 min de stimulation au LPS. Les graphes présentent la quantification du rapport entre la forme phosphorylée et la forme totale de CREB après que les abondances relatives de celles-ci aient été normalisées à celle de l' α -tubuline (utilisée comme contrôle de charge). Les résultats sont exprimés de façon relative au temps 0 (cellules dans du RPMI complet). (b) Mesure de l'abondance relative du pri-miR-132/212 après 6h de stimulation. Les résultats, normalisés à l'abondance de la GAPDH, sont exprimés de façon relative au temps 0. (c) Mesure de l'abondance relative des miR-132 et miR-212 après 24h de stimulation. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'abondance du RNU-44 et sont exprimés de façon relative au temps 0. Les valeurs d'expression relative du pri-miR-132/212 et des miR-132 et miR-212 représentent la moyenne de deux mesures en PCR en temps réel réalisées à partir d'une seule série d'échantillons biologiques.

des cellules avec ces inhibiteurs réprime partiellement (Ro-31-8220) voire totalement (H-89) l'augmentation de la phosphorylation de CREB résultant de la stimulation au LPS (par comparaison avec les cellules pré-incubées dans du DMSO en concentrations correspondantes aux pré-incubations avec les inhibiteurs).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets de ces inhibiteurs sur l'expression de la forme primaire des miR-132 et miR-212 (figure 3.11b). Le H-89 inhibe fortement l'induction du pri-miR-132/212 observée lors de la stimulation des cellules au LPS. En effet, l'incubation des cellules avec du H-89 permet de réprimer presque totalement l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS. De plus, le H-89 semble aussi réprimer l'expression du pri-miR-132/212 dans les cellules contrôles. Ceci suggère que le H-89 inhiberait non seulement un facteur impliqué dans l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS, mais jouant également un rôle dans sa transcription basale. L'inhibiteur Ro-31-8220 semble également réprimer l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS. L'effet de cet inhibiteur sur l'expression du pri-miR-132/212 est cependant nettement moins marqué que celui du H-89.

En ce qui concerne l'expression des formes matures (figure 3.11c), le H-89 réprime partiellement l'induction en réponse au LPS des miR-132 et miR-212 ainsi que l'expression de ces miRNAs en condition contrôle. Le Ro-31-8220 semble également réprimer l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS ; toutefois, il ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des miRNAs en condition contrôle.

Il faut signaler que les données présentées à la figure 3.11 ne sont encore qu'indicatives et que ces résultats demandent à être reproduits. Un réplicat de cette manipulation a été réalisé durant ce mémoire mais est peu interprétable étant donné la très faible induction des miRNAs matures dans les cellules stimulées au LPS lors de cette expérience. Toutefois, l'analyse de l'expression du pri-miRNA au cours de ce réplicat a montré une tendance similaire à celle décrite précédemment pour le H-89 ainsi qu'un effet plus marqué du Ro-31-8220 par rapport à la manipulation précédente (cette analyse a été possible étant donné l'amplitude importante de l'induction de la forme primaire qui, bien que réduite de près de trois fois par rapport à la manipulation précédente, était induite d'environ 30 fois dans les cellules stimulées au LPS et pré-incubées dans du RPMI base).

Bien que préliminaires, les résultats présentés à la figure 3.11 suggèrent que les deux inhibiteurs de MSK1 testés répriment l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. De plus, le H-89 semble également inhiber l'expression de ces miRNAs dans les cellules non stimulées. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le facteur de transcription CREB, activé en aval de la kinase MSK1, serait impliqué dans la surexpression des miR-132 et miR-212 lors d'une stimulation au LPS des cellules THP-1 et peut-être également dans leur transcription en condition basale. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Remenyi *et al.* (Remenyi et al., 2010) dans le contexte neuronal chez la souris et confortent les hypothèses avancées par d'autres équipes concernant le rôle de CREB dans la transcription des miR-132 et miR-212 dans d'autres contextes (Strum et al., 2009, Lagos et al., 2010, Hollander et al., 2010). Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les deux inhibiteurs utilisés inhibent des protéines autres que la kinase MSK1. Le H-89 par exemple, a été initialement développé en tant qu'inhibiteur de la PKA. Or, il a été rapporté que la stimulation au LPS de monocytes THP-1 activait la voie de la PKA et résultait en une augmentation de la phosphorylation de CREB (Bshesh et al., 2002). Bien que cette observation nécessiterait d'être validée dans des cellules différenciées, on ne peut exclure qu'une partie des effets du H-89 sur l'expression du pri-miR-132/212 ne soit dépendante de l'inhibition de cette protéine. L'effet potentiel de

CREB sur l'expression des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS pourrait donc résulter de l'activation de ce facteur en aval de MSK1 mais aussi de la PKA. En outre, en inhibant l'activité d'autres protéines kinases que les MSK1, les inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220 sont susceptibles de moduler l'activité d'autres facteurs de transcription potentiellement impliqués dans l'expression des miR-132 et miR-212 (la PKA par exemple, qui est inhibée par le H-89 peut phosphoryler, outre CREB, le facteur NF- κ B (Matt, 2002)). En outre, la kinase MSK1 elle-même agit sur d'autres cibles que CREB. En effet, les facteurs de transcription ATF-1, STAT-3, Ets1 (Ets transcript variant 1) ainsi que la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B peuvent être phosphorylés par MSK1 (Vermeulen et al., 2009). Or, en ce qui concerne p65, il a été rapporté que la phosphorylation par MSK1 de son résidu sérine 276 était essentielle pour son association avec ses partenaires protéiques nucléaires, l'activité d'histone acétyl-transférase qui leur est associée et donc la transcription des gènes cibles de NF- κ B. De plus, des chercheurs ont montré que le traitement de fibroblastes avec l'inhibiteur H-89 réprimait la transactivation (mais pas l'activité de liaison à l'ADN) de p65 en réponse à une stimulation au TNF- α (Vermeulen et al., 2003). Par ailleurs, il a aussi été démontré que MSK1 jouait un rôle dans le remodelage de la chromatine en réponse à l'activation des MAPK. En effet, MSK1 est capable de phosphoryler la protéine HMG1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1 ; également connue sous le nom de HMG-14), de déstabiliser de cette façon son interaction avec les nucléosomes et d'ainsi avoir accès à l'histone H3, qu'elle phosphoryle également (Dunn et al., 2005). La phosphorylation de cette histone jouerait un rôle dans le remodelage des promoteurs au niveau desquels MSK1 est recruté (notamment par l'intermédiaire de facteurs de transcription comme NF- κ B ou Elk-1) (Drobic et al., 2010). Il se pourrait donc que la répression de l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS dans les cellules incubées avec les inhibiteurs de MSK1 soit en partie dépendante, outre la répression de la phosphorylation de CREB, de ce phénomène. Il a d'ailleurs été démontré que l'incubation de cellules avec l'inhibiteur H-89 bloquait la phosphorylation de l'histone H3 en aval des MAPK (Soloaga et al., 2003).

L'inhibition de facteurs de transcription constitue une première approche dans l'étude des mécanismes transcriptionnels responsables de l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Une approche complémentaire consiste à cloner une région promotrice putative de ces miRNAs dans un plasmide rapporteur. Cette approche, généralement utilisée dans le but de localiser les régions promotrices minimales et principales d'un gène d'intérêt, permet aussi de valider les sites de liaison fonctionnels des facteurs de transcription régulant son expression. En outre, la transfection d'une construction rapportrice pourrait engendrer moins d'altérations des réponses cellulaires que la transfection de siRNA, étant donné qu'elle nécessite une efficacité de transfection moindre.

V. Construction d'un plasmide rapporteur luciférase contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212

Dans le but de déterminer la région promotrice principale des miR-132 et miR-212 et de valider le rôle putatif de certains facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de ces miRNAs par le LPS, nous avons cloné une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase encodé par le plasmide pGL4.10 [luc2] (Promega).

V.1. Analyse de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 et sélection d'une région promotrice putative

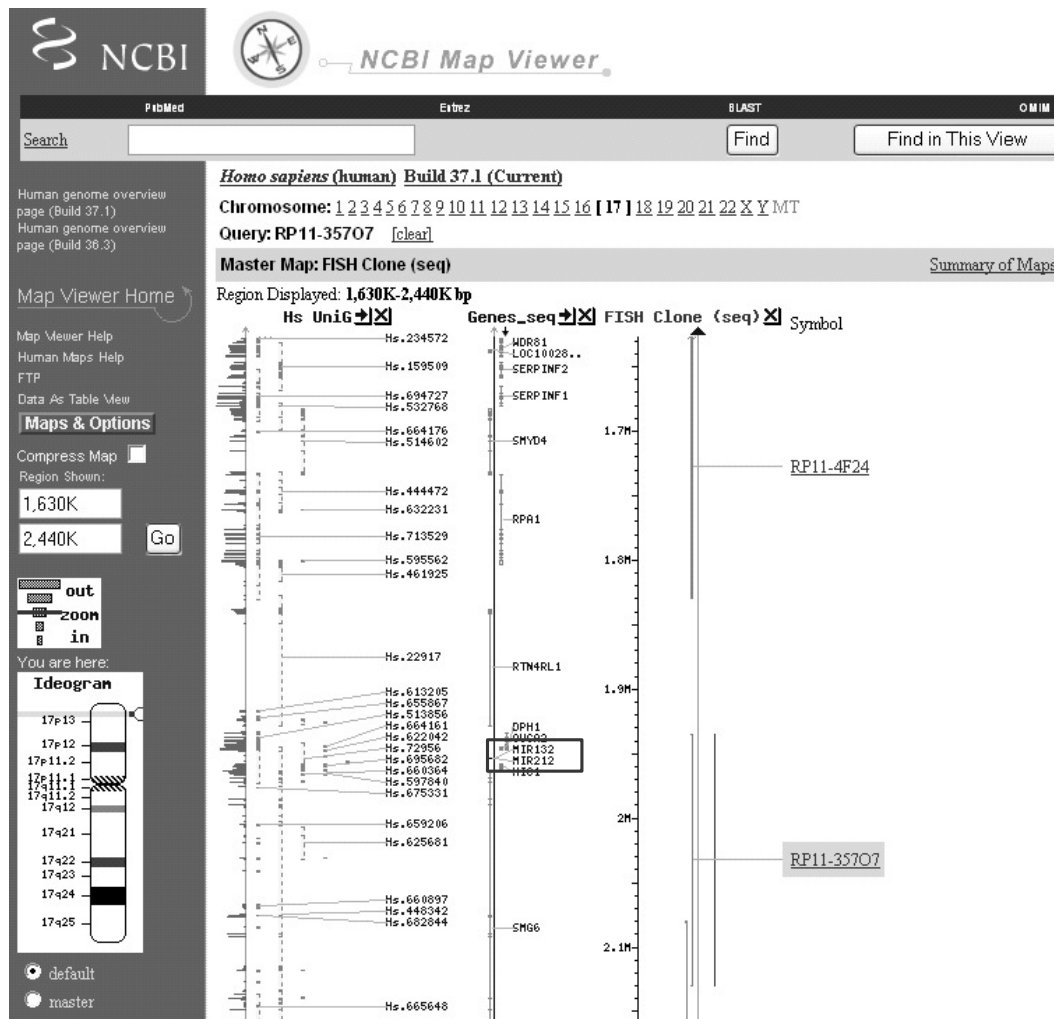
Afin de sélectionner une région promotrice putative des miR-132 et miR-212, nous avons d'une part analysé une région d'un peu moins de 5500 pb avec le logiciel Transfac (Biobase) (point IV.1), qui permet de prédire des sites de liaison consensus pour des facteurs de transcription, et avons d'autre part analysé les prédictions bioinformatiques d'identification des régions promotrices de miRNAs réalisées par différents auteurs (voir Introduction, point I.3.a).

La figure 3.12 illustre les différentes prédictions bioinformatiques de localisation de la région promotrice des miR-132 et miR-212 ainsi que la région promotrice putative que nous avons choisi de cloner dans le plasmide rapporteur. La région encadrée par les flèches oranges représente la région promotrice putative identifiée pour les miR-132 et miR-212 humains par l'équipe de Marson *et al.* (Marson et al., 2008). Cette équipe s'est basée sur la présence de modifications des protéines histones (triméthylation sur le résidu lysine 4 de l'histone 3), la proximité entre ces marques des histones et l'extrémité d'un transcrit couvrant la région des miRNAs d'intérêt ainsi que sur la conservation du motif de modification des histones chez l'homme et la souris. La région promotrice identifiée par cette équipe, d'une longueur de 2265 pb, s'étend de 1675 pb en amont du pre-miR-212 à 117 pb en aval du pre-miR-132. L'équipe de Zhou *et al.* (Zhou et al., 2007) a quant à elle identifié une région promotrice principale putative (encadrée par des flèches rouges) pour le miR-212. Cette région promotrice principale, identifiée à l'aide de l'algorithme CoVote, s'étend de 541 à 286 pb en amont du pre-miR-212. Wang et ses collègues se sont quant à eux basés entre autres sur des immunoprécipitations de chromatine liée à l'ARN polymérase II afin d'identifier les promoteurs de certains miRNAs, dont celui des miR-132 et miR-212 (l'extrémité amont du promoteur identifié par cette étude est représenté par des flèches bleues ; il se prolonge jusqu'à 770 nucléotides en aval du pre-miR-132) (Wang et al., 2010).

Nous avons décidé de cloner dans un plasmide rapporteur la région promotrice putative représentée en gras sur la figure 3.12. Cette région s'étend depuis l'extrémité aval de la zone de répétitions décrite précédemment (point IV.1) jusqu'au pre-miR-212. Cette région a été choisie de façon à d'une part englober l'extrémité amont des différents promoteurs putatifs prédits au cours des études bioinformatiques présentées à la figure 3.12 et à d'autre part inclure l'extrémité amont du pre-miR-212 (étant donné que les limites du pri-miR-132/212 ne sont pas encore déterminées).

V.2. Construction du plasmide rapporteur

La stratégie de construction du plasmide rapporteur encodant un promoteur putatif des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase est illustrée dans la partie « Matériel et méthodes », à la figure 2.5. Cette stratégie consiste tout d'abord en l'amplification de la région promotrice putative à l'aide d'amorces comportant des sites de restriction (BglII et HindIII) compatibles avec ceux présents dans le site multiple de clonage du plasmide rapporteur (pGL4.10 [luc2]). Ces sites de restriction sont utilisés de façon à permettre un clonage directionnel de la région promotrice putative dans le plasmide rapporteur. Cependant, la région promotrice putative amplifiée par PCR n'est pas directement clonée dans ce plasmide, car les enzymes de restriction ne restreignent pas efficacement les sites localisés près d'une extrémité de fragment d'ADN. La région promotrice putative est donc d'abord



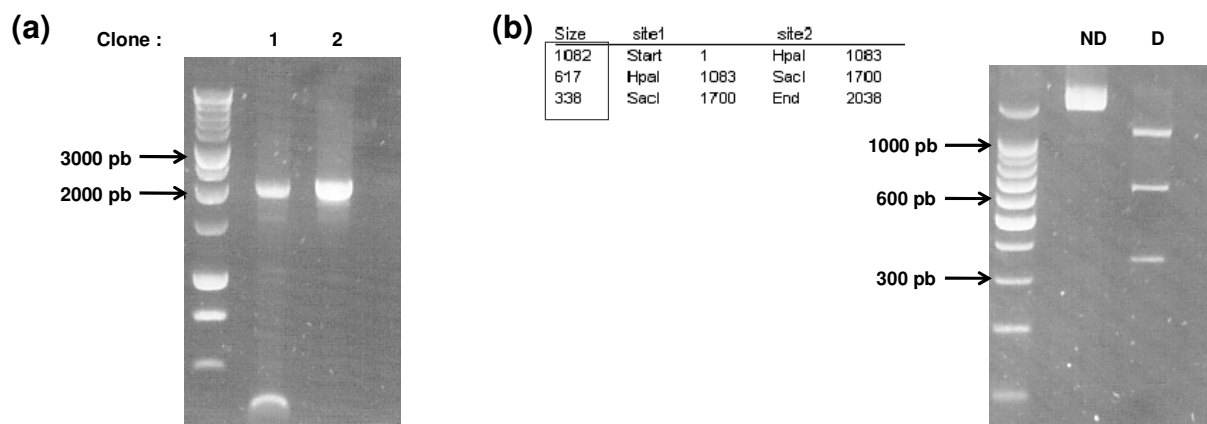


Figure 3.14 : Amplification par PCR de la région promotrice putative des gènes encodant les miR-132 et miR-212 (a) et restriction diagnostique par les enzymes SacI et HpaI (b) (voir Matériel et méthodes, points V.2.b, V.2.c et V.2.d). (a) Amplification de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 à partir du BAC RP11-35707 purifié à partir de deux clones bactériens. Etant donné que l'amplification de la région promotrice putative à partir du clone 2 était plus efficace et spécifique, ce clone a été utilisé pour la construction du plasmide rapporteur. (b) Profil de restriction du produit de taille attendue par les enzymes de restriction SacI et HpaI. Les longueurs des fragments attendus suite à cette double digestion ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE. La piste ND (non digéré) représente le produit d'amplification de la région promotrice putative obtenu à partir du clone 2, tandis que la piste D (digéré) représente les fragments générés suite à la double restriction de ce produit par les enzymes SacI et HpaI.

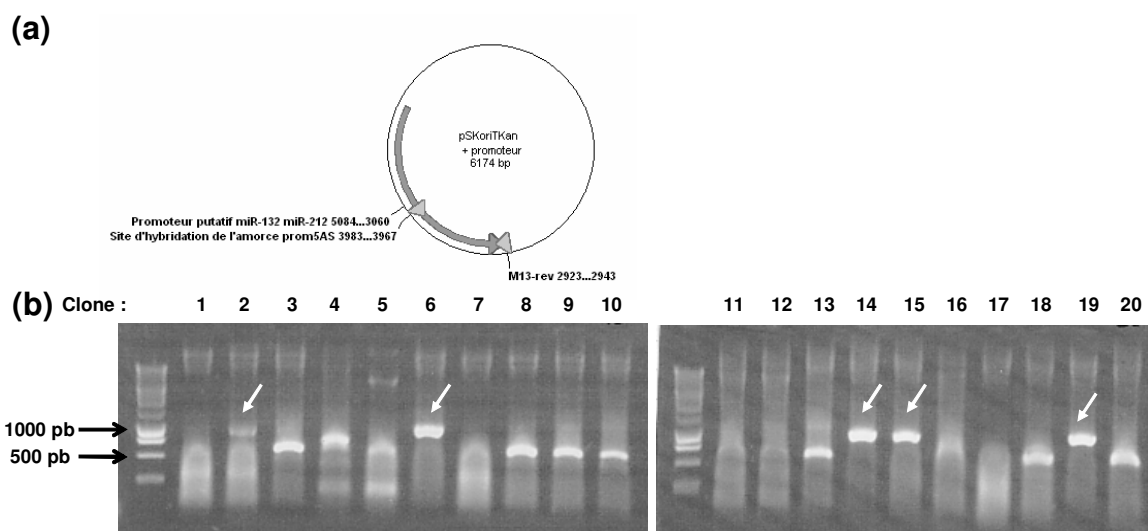


Figure 3.15 : Identification des plasmides pSKOriTKan comprenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 dans l'orientation désirée (plasmide « pSKOriTKan + promoteur » représenté à gauche sur la figure 2.5 du Matériel et méthodes). Les plasmides issus de 20 clones transformés par un plasmide avec insert (apparaissant blancs sur un milieu contenant du X-Gal et de l'IPTG) ont été extraits et utilisés comme matrice pour la réalisation de PCR. (a) Représentation des sites d'hybridation des amorces utilisées pour cette PCR. (b) Résultats des PCR. Des produits d'une taille de 1059 pb sont attendus pour les clones comportant la région promotrice putative insérée selon l'orientation désirée.

insérée dans un plasmide intermédiaire (pSKoriTKan), séquencée, puis restreinte à l'aide des deux enzymes de restriction et clonée dans le plasmide rapporteur.

Nous avons tout d'abord essayé d'amplifier la région promotrice putative de 2025 pb à partir d'ADN génomique de cellules THP-1, avec une polymérase exerçant une activité de relecture, afin de réduire l'occurrence des mutations introduites par l'enzyme lors de l'amplification. Cependant, malgré de multiples tentatives d'optimisation (concernant la quantité d'ADN génomique matrice et les températures d'hybridation des amorces), nous ne sommes pas parvenus à amplifier de façon spécifique la région promotrice putative désirée. En effet, nous avons purifié sur gel un fragment de taille attendue (2037 pb, dont les 2025 pb de la région promotrice putative et deux fois 6 pb représentant les sites de restriction BglII et HindIII), l'avons ligué dans le plasmide intermédiaire pSKoriTKan et l'avons ensuite séquencé. Toutefois, cette séquence s'est avérée être différente de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (données non montrées).

Partant de l'hypothèse que l'amplification de la région promotrice putative pourrait être rendue difficile par la complexité de l'ADN génomique utilisé comme matrice (la taille du génome humain est approximativement de 3 milliards de paires de bases), nous avons décidé d'utiliser comme matrice le chromosome artificiel bactérien (BAC) RP11-357O7⁴, qui comporte un fragment du chromosome 17 humain couvrant la région des miR-132 et miR-212 (figure 3.13). Bien que la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 n'ait pas pu être amplifiée non plus par une polymérase possédant une activité de relecture (Phusion polymerase, Finnzyme) en utilisant cette matrice (et ce, malgré plusieurs tentatives d'optimisation et l'utilisation d'un tampon adapté aux séquences riches en GC), nous sommes parvenus à amplifier une région de taille attendue (2037 pb) en utilisant une polymérase classique (GoTaq DNA polymerase, Promega) (figure 3.14a). Une double restriction de cet amplicon nous a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (figure 3.14b).

La région promotrice putative a ensuite été liguée dans le plasmide intermédiaire pSKoriTKan préalablement ouvert suite à une restriction par EcoRV (Matériel et méthodes, point V.2.e) et les produits de ligation ont été transformés en bactéries compétentes. Malgré que le plasmide pSKoriTKan dispose d'un système de criblage blanc/bleu permettant l'identification des clones transformés par un plasmide comportant un insert, des PCR ont été réalisées afin de valider la présence de la région promotrice putative (Matériel et méthodes, point V.2.g). La figure 3.15 illustre les résultats de ces PCR. Les cinq clones pour lesquels un produit de taille attendue a été obtenu ont été sélectionnés (clones 2, 6, 14, 15 et 19) et séquencés. Les résultats du séquençage des clones 2, 6 et 14 ainsi que l'alignement de ces séquences par rapport à la séquence de référence (reflNT 010718.16l) sont présentés en annexe 2 (le séquençage n'a pas pu être effectué pour les clones 15 et 19 malgré plusieurs tentatives, sans doute suite à la complexité de la séquence et ce, malgré le choix d'un protocole de séquençage adapté aux séquences difficiles). Chacun des clones séquencés comporte plusieurs mutations (4 à 6 selon les clones) dans la séquence du promoteur putatif des miR-132 et miR-212. Ces mutations étant situées au niveau de sites différents dans les trois clones séquencés, nous avons tout de

⁴ La librairie de BAC RP11 a été élaborée par l'équipe d'Osoegawa *et al.* au Roswell Park Cancer Institute à partir de l'ADN d'un homme sélectionné au hasard parmi 10 volontaires dont l'identité est inconnue suite à une procédure réalisée en double-aveugle (OSOEGAWA, K., MAMMOSER, A. G., WU, C., FRENGEN, E., ZENG, C., CATANESE, J. J. & DE JONG, P. J. 2001. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*, 11, 483-96.).

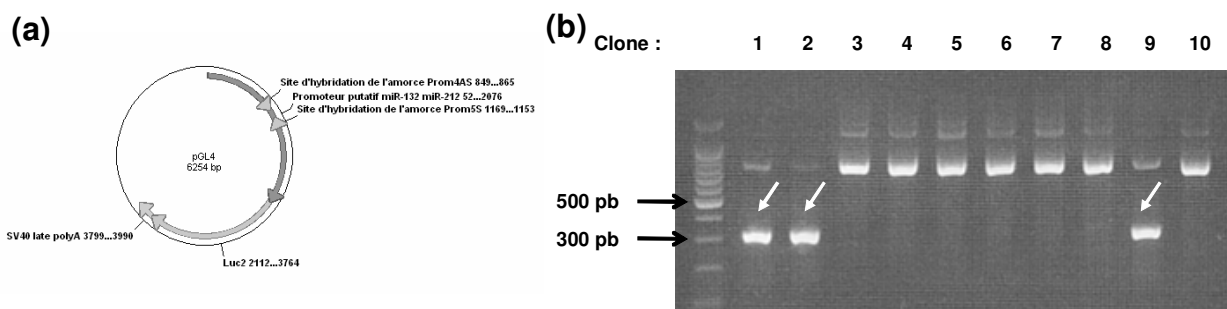


Figure 3.16 : Identification par PCR sur colonies des clones transformés par un plasmide pGL4.10[luc2] contenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212. (a) Représentation des sites d'hybridation des amorces utilisées pour cette PCR. (b) Résultats des PCR. Des produits de 321 pb sont attendus pour les clones comportant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (les autres produits résultent d'amplifications aspécifiques). Dix PCR sur colonies ont été effectuées par mélange de ligation du plasmide rapporteur et de la région promotrice putative. La figure ci-dessus représente donc les résultats de PCR sur colonies, réalisées à partir des clones bactériens transformés par les mélanges de ligation obtenus suite à l'excision de la région promotrice putative du pSKoriTKan d'un seul des trois clones sélectionnés précédemment (clones 2, 6 et 14 de la figure précédente) et sa ligation dans le plasmide pGL4.10. En tout, 30 PCR sur colonies ont donc été effectuées afin de sélectionner une construction contenant la région promotrice putative des 3 clones séquencés.

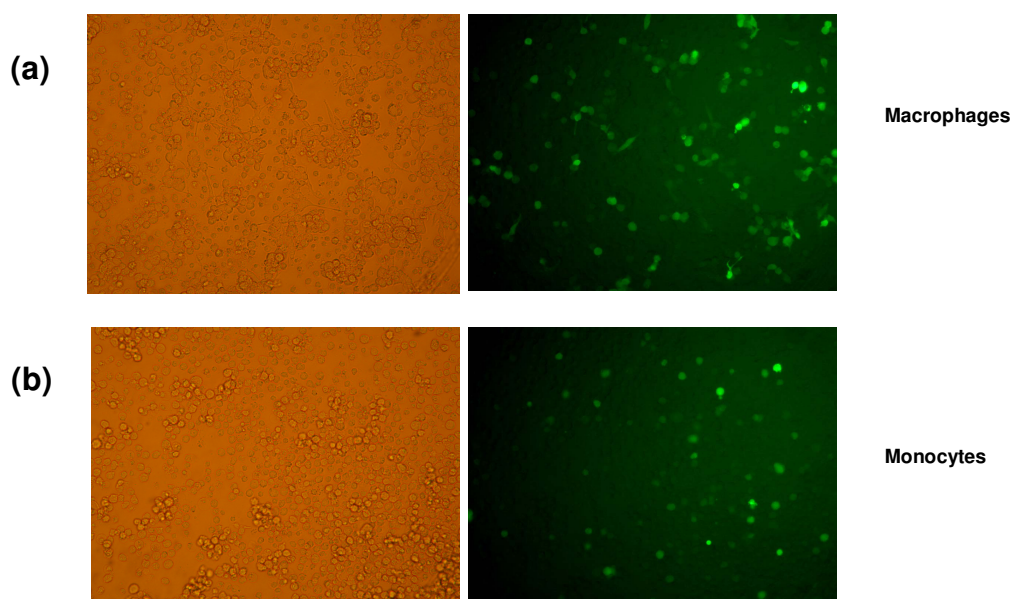


Figure 3.17 : Evaluation de l'efficacité de la nucléofection de plasmides dans des cellules THP-1. Deux nucléofections de 1.10^6 cellules ont été effectuées en présence de $0,075 \mu\text{g}$ de plasmide pSV40RL et de $0,325 \mu\text{g}$ de plasmide pEGFP. Deux heures après la nucléofection, le milieu des cellules a été remplacé et les cellules issues d'une des deux nucléofections ont été différenciées par l'ajout de PMA (a) ou laissées sans traitement (b). L'efficacité de transfection a été évaluée 24h après la nucléofection suite à une observation des cellules nucléofectées en microscopie à fond clair et en microscopie à fluorescence.

même poursuivi les constructions à partir de ces trois clones, avec l'intention d'évaluer leur inductibilité par le LPS.

Les régions promotrices putatives ont été excisées du pSKOriTKan à l'aide des enzymes BglII et HindIII et clonées dans le plasmide rapporteur pGL4.10 [luc2], lui-même préalablement restreint avec les mêmes enzymes. Les mélanges de ligation ont ensuite été transformés en bactéries compétentes. Le plasmide rapporteur ne disposant pas d'un système de criblage permettant la sélection des plasmides ayant intégré un insert, des PCR sur colonies (10 par mélange de ligation provenant d'un clone pSKOriTKan + région promotrice putative) ont été effectuées afin de sélectionner les clones transformés par le plasmide rapporteur contenant la région promotrice putative des miRNAs (figure 3.16). Les clones comportant la région promotrice putative insérée en amont du gène rapporteur ont ensuite été amplifiés et les plasmides extraits.

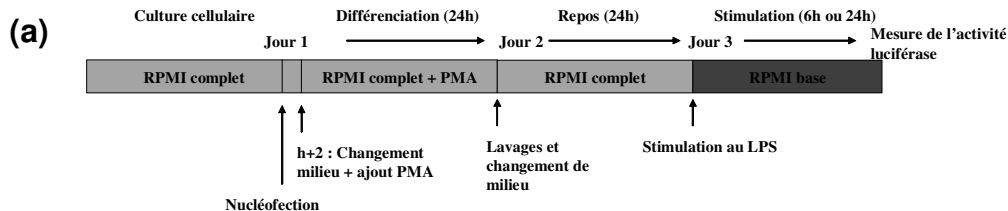
V.3. *Transfection du plasmide rapporteur dans les cellules THP-1*

V.3.a. Optimisation de la transfection plasmidique

Afin d'optimiser les conditions de transfection de plasmides dans les cellules THP-1, nous avons testé l'efficacité de 4 agents de transfection (Lipofectamine 2000, JetPEI Macrophages, Attractène, DEAE Dextran) (données non montrées). Seule la Lipofectamine 2000 nous a permis, dans certaines conditions, de transfecter un plasmide encodant la GFP. Les premiers essais de transfection de la construction contenant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase de Firefly ont donc été réalisés avec de la Lipofectamine 2000. Afin de pouvoir normaliser l'activité luciférase de Firefly, contrôlée par le promoteur putatif des miRNAs, au taux de transfection, nous avons co-transfecté un plasmide pSV40RL (encodant la luciférase de rénilla) (voir Matériel et méthodes, point V.3.c). Cependant, une variabilité très importante de l'activité luciférase de Firefly et de rénilla était observée entre les doubles, nous empêchant de mettre en évidence des différences d'activité du promoteur cloné résultant de la stimulation au LPS. Cette variabilité était probablement due à une très faible efficacité de transfection de la construction qui pourrait être liée au fait que la construction (6,25 kb) est plus grande que le plasmide pEGFP initialement utilisé pour évaluer l'efficacité de la transfection (4,7 kb). Nous avons donc opté pour une autre méthode de transfection, la nucléofection. Cette méthode nous a permis de transfecter un nombre satisfaisant de cellules (figure 3.17).

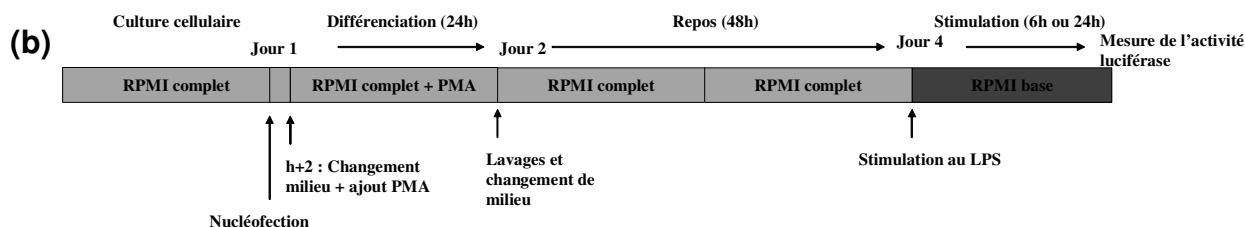
V.3.b. Nucléofection du plasmide rapporteur contenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212

Nous avons nucléofecté la construction rapportrice ainsi que le plasmide de normalisation dans des monocytes THP-1, les avons différenciés, mis au repos pendant 24h puis stimulés au LPS pendant 6h et 24h. Les résultats des mesures de l'activité luciférase de Firefly et de rénilla (ainsi que la représentation schématique de l'expérience) sont présentés à la figure 3.18a. Avant toute chose, il est important de remarquer que l'activité luciférase de rénilla démontre une forte variabilité entre des cellules qui, à priori, ont été transfectées avec une même efficacité. En effet, les cellules issues d'une seule nucléofection ont été réparties dans 4 puits pour l'étude des conditions contrôles et LPS après 6h ou 24h de stimulation. Si le

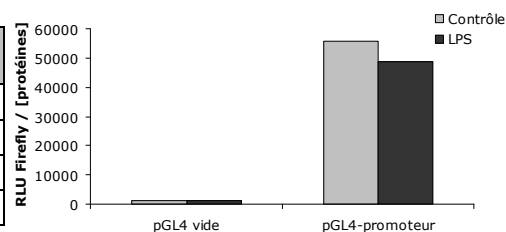


24h repos + 6h stimulation		Firefly (RLU)	Rénilla (RLU)	RLU Firefly/RLU Rénilla
pGL4 vide	CTL	1155	224	5,15625
pGL4 vide	LPS	1111	72	15,4305556
pGL4-promoteur (clone2)	CTL	43752	112	390,642857
pGL4-promoteur (clone2)	LPS	31247	150	208,313333

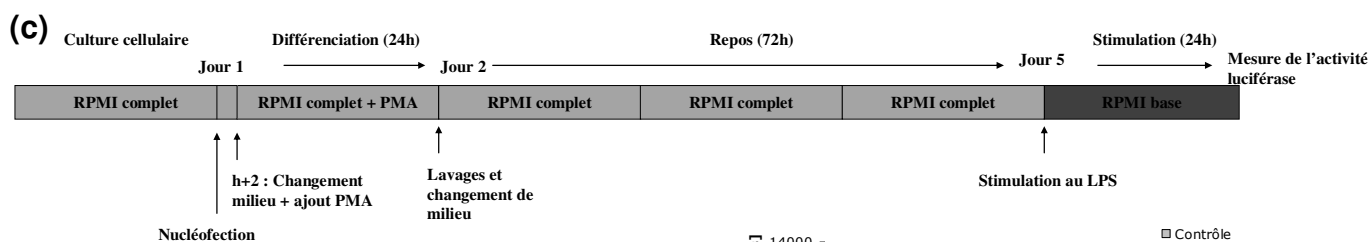
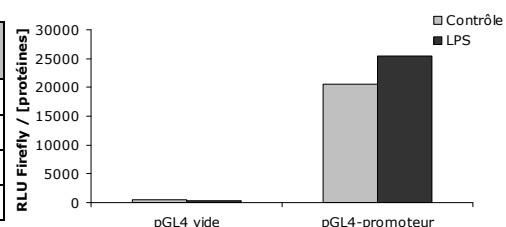
24h repos + 24h stimulation		Firefly (RLU)	Rénilla (RLU)	RLU Firefly/RLU Rénilla
pGL4 vide	CTL	135	-491	-0,27494908
pGL4 vide	LPS	266	-309	-0,86084142
pGL4-promoteur (clone2)	CTL	24835	792	31,3573232
pGL4-promoteur (clone2)	LPS	21305	335	63,5970149



48h repos + 6h stimulation		Firefly (RLU)	Rénilla (RLU)	RLU Firefly/RLU Rénilla	[Protéines] (µg/µl)	RLU Firefly/[protéines]
pGL4 vide	CTL	340	995	0,34170854	0,2933	1159,22264
pGL4 vide	LPS	313	1050	0,29809524	0,2405	1301,4553
pGL4-promoteur (clone2)	CTL	11141	648	17,1929012	0,1994	55872,6179
pGL4-promoteur (clone2)	LPS	10216	3399	3,00558988	0,2092	48833,652



48h repos + 24h stimulation		Firefly (RLU)	Rénilla (RLU)	RLU Firefly/RLU Rénilla	[Protéines] (µg/µl)	RLU Firefly/[protéines]
pGL4 vide	CTL	106	737	0,14382632	0,2636	402,124431
pGL4 vide	LPS	88	1498	0,05874499	0,2765	318,264014
pGL4-promoteur (clone2)	CTL	4226	116	36,4310345	0,2059	20524,5265
pGL4-promoteur (clone2)	LPS	5236	2720	1,925	0,2065	25355,9322



72h repos + 24h stimulation		Firefly (RLU)	[Protéines] (µg/µl)	RLU Firefly/[protéines]
pGL4 vide	CTL	190	0,2444	777,414075
pGL4 vide	LPS	156	0,2542	613,690008
pGL4-promoteur (clone2)	CTL	2786	0,2274	12251,5391
pGL4-promoteur (clone2)	LPS	1321	0,1975	6688,60759

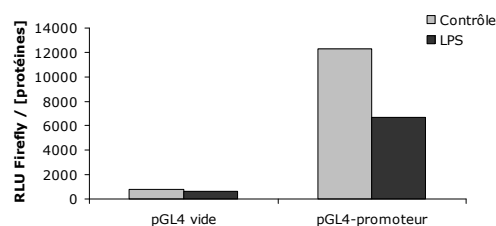


Figure 3.18 : Effet du LPS sur le plasmide rapporteur contenant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212. Les mesures de l'activité luciférase de Firefly – sous le contrôle du promoteur putatif des miR-132 et -212 – et de rénilla – sous le contrôle du promoteur SV40 – ont été réalisées après 6h et 24h de stimulation au LPS dans des macrophages préalablement mis au repos pendant 24h (a), 48h (b) ou 72h (c). Les concentrations protéiques ont été déterminées par dosage de Pierce.

promoteur SV40 qui contrôle l'activité luciférase de *rénilla* était effectivement un promoteur constitutif dans les conditions étudiées, les activités luciférase de *rénilla* auraient dû être proches pour toutes les cellules transfectées par le pGL4-promoteur 1 (et pour toutes celles transfectées par le pGL4 « vide », c'est-à-dire ne contenant pas de promoteur pour contrôler l'expression de la luciférase de Firefly) de la figure 3.18a. Ce plasmide ne semble donc pas adapté pour la normalisation des résultats par rapport à l'efficacité de la transfection.

En analysant les valeurs non normalisées de l'activité luciférase de Firefly, on remarque que celles-ci sont supérieures dans les cellules transfectées par le plasmide encodant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 que dans les cellules transfectées par le plasmide rapporteur vide. Ceci suggère que le promoteur putatif cloné dans le plasmide rapporteur est actif. Toutefois, contrairement aux résultats attendus, l'activité de ce promoteur n'est pas supérieure dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. En effet, les valeurs de l'activité luciférase de Firefly sont supérieures dans les cellules contrôles transfectées par la construction encodant le promoteur putatif par rapport aux cellules stimulées au LPS. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux autres clones séquencés (résultats non montrés). En émettant l'hypothèse que le processus de nucléofection pourrait activer des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212, nous avons décidé de répéter cette manipulation en laissant les cellules pendant 48h ou 72h au repos avant de les stimuler (figure 3.18b et c). En outre, étant donné que les mesures de l'activité luciférase de *rénilla* ne semblent pas adaptées à la normalisation de l'activité luciférase de Firefly (il a d'ailleurs été rapporté que les promoteurs viraux SV40 et CMV pouvaient être induits lors de la stimulation au LPS de macrophages transfectés de façon stable ou transitoire par des plasmides exprimant des gènes rapporteurs sous leur contrôle (Sweet and Hume, 1996)), nous avons utilisé les cellules provenant d'une même nucléofection pour tester les conditions LPS et contrôle après 6h et 24h de stimulation et avons dosé les contenus protéiques de façon à normaliser les résultats par la quantité de protéines. Les résultats présentés à la figure 3.18b montrent qu'après 6h de stimulation, l'activité du promoteur putatif est toujours plus élevée dans les cellules contrôles que dans les cellules stimulées au LPS. La tendance semble s'inverser après 24h de stimulation, cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits dans les cellules mises au repos pendant 72h.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence d'inductibilité du promoteur cloné par le LPS, notamment le clonage d'une région trop restreinte ou ne comportant pas les sites de liaison essentiels à l'induction de l'activité du promoteur des miRNAs ; le rôle potentiel de modifications de la structure de la chromatine dans l'expression des miR-132 et miR-212 ; ou encore l'influence de perturbations des voies de signalisation causées par les stress dus à la transfection du plasmide rapporteur. Chacune de ces hypothèses est discutée dans les paragraphes suivants.

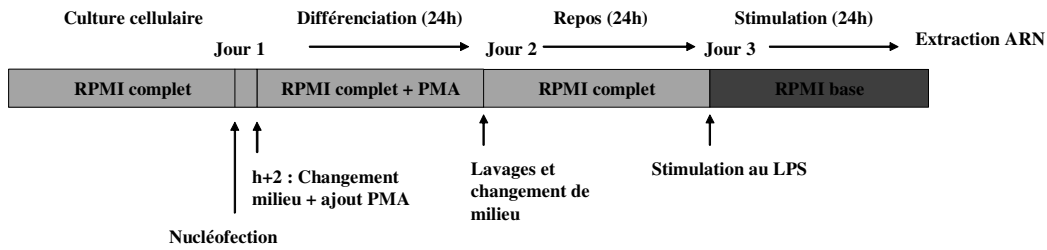
Premièrement, il est possible que le ou les site(s) essentiel(s) à l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS soi(en)t situé(s) en amont ou en aval de la région promotrice putative clonée. Dans ce cas, la région clonée pourrait être suffisante pour permettre une activité transcriptionnelle basale, mais serait dépourvue des éléments nécessaires à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en réponse au LPS. Lorsque la région située en amont des miR-132 et miR-212 est analysée à l'aide du logiciel Transfac en utilisant une matrice spécifique des cellules immunes, deux sites PU.1 (ce facteur de transcription appartient à la famille Ets) sont identifiés, dont l'un d'eux est situé en amont de la région clonée (voir annexe 1). Or, il a été rapporté que les sites de liaison de ce facteur de transcription étaient les sites les plus enrichis dans les éléments enhancer induits par le LPS

dans des macrophages murins, ce qui suggère que PU.1 pourrait marquer les éléments enhancer induits par le LPS (Ghisletti et al., 2010). D'autre part, de nombreux sites de liaison putatifs pour différents facteurs de transcription (dont CREB, NF- κ B et AP-1) sont situés en amont et en aval de la région clonée (voir annexe 1). L'équipe de Remenyi a mis en évidence il y a quelques mois que trois sites de liaison pour CREB, conservés chez l'homme et la souris, étaient importants pour la transcription des miR-132 et miR-212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines (Remenyi et al., 2010). Or, l'un de ces trois sites est situé entre les pre-miR-212 et pre-miR-132 et n'a pas été cloné dans la construction rapportrice élaborée au cours de ce mémoire (voir illustration en annexe 3). Malgré que ces auteurs n'aient pas réalisé de délétion de ce dernier site en particulier, il se pourrait que celui-ci, bien que situé en aval du site d'initiation de la transcription, soit d'une importance prépondérante dans l'expression des miR-132 et miR-212. La liaison de CREB à ce site (ainsi qu'aux deux autres mentionnés précédemment) a d'ailleurs été confirmée par empreinte de digestion à la DNase I dans des neurones corticaux de rats (Vo et al., 2005). Par ailleurs, toute une série de sites de liaison putatifs pour différents facteurs de transcription (Sp1 (specificity protein 1), Kid3, ETF (EGFR-specific transcription factor), CREB, REST (RE1 silencing transcription factor)) situés entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 présentent un ordre conservé chez l'homme et la souris. Ceci suggère que ces sites pourraient également jouer un rôle dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212.

Deuxièmement, dans une même optique mais en suivant un raisonnement inverse, il se pourrait que des sites de répression de la transcription, importants pour ne garantir qu'une faible expression en condition contrôle, n'aient pas été clonés. Il est à ce sujet particulièrement intéressant de signaler qu'un site de liaison pour le répresseur transcriptionnel REST est présent entre les séquences des pre-miR-212 et pre-miR-132 et extrêmement bien conservé chez l'homme et la souris (voir illustration en annexe 3). Ce répresseur transcriptionnel, qui réprime l'expression des gènes neuronaux dans les cellules non-neuronales, interagit avec des co-répresseurs recrutant eux-mêmes des histones désacétylases responsables de la répression de l'expression des gènes cibles. Or, il a été démontré par des analyses d'occupation de la chromatine à grande échelle (SACO) que des répresseurs REST occupaient le site de liaison situé en amont du pre-miR-132 dans des cellules non-neuronales murines (Conaco et al., 2006). Il se pourrait donc, bien que ceci nécessiterait de confirmer la présence de REST sur son site de liaison dans les cellules THP-1, que ce répresseur soit impliqué dans la faible expression des miR-132 et miR-212 en condition basale.

Troisièmement, l'état de condensation de la chromatine pourrait exercer un rôle majeur dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. En effet, la chromatine agit en tant que répresseur transcriptionnel en bloquant l'accès des différents composants de la machinerie transcriptionnelle au promoteur. Dans certaines conditions, des facteurs de transcription et les co-activateurs qui leur sont associés induisent des modifications de la structure de la chromatine permettant l'accessibilité des régions promotrices et des sites d'initiation de la transcription (Skoog et al., 2006). L'ADN plasmidique étant dépourvu d'histones, l'environnement et l'accessibilité du promoteur cloné et du promoteur endogène sont totalement différents. Il se pourrait donc que la stimulation au LPS induise l'expression des miR-132 et miR-212 principalement en modifiant l'état de condensation de la chromatine ; ceci pourrait expliquer qu'on ne perçoive pas de différences en analysant l'expression d'un promoteur putatif cloné dans un plasmide.

(a)



(b)

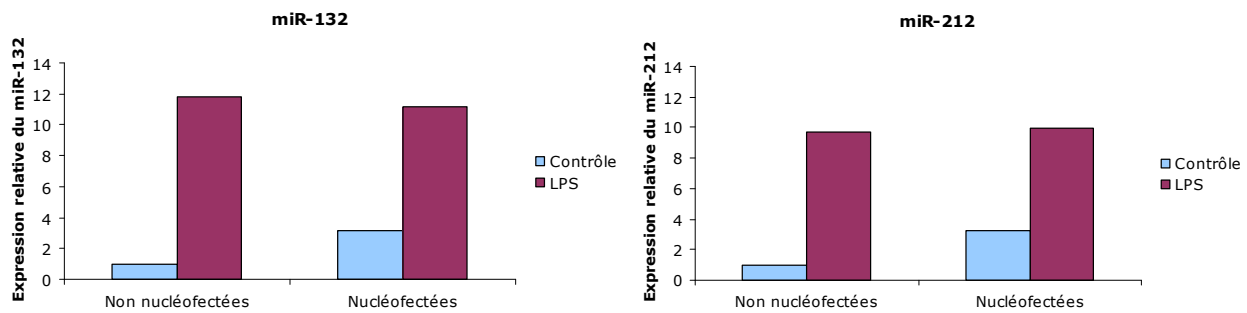


Figure 3.19 : Les miR-132 et miR-212 sont induits dans les macrophages THP-1 nucléofectés et stimulés au LPS. (a) Illustration de la chronologie de la manipulation. Deux heures après leur nucléofection, les monocytes ont été changés de milieu et différenciés par l'ajout de PMA. 24h après l'ajout de PMA, les macrophages ont été mis au repos pendant 24h, avant d'être stimulés avec 1 μ g/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») pendant encore 24h. (b) L'abondance des miRNAs (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative aux cellules non nucléofectées contrôles. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques.

Quatrièmement, il se pourrait que les stress induits par la nucléofection activent des facteurs de transcription régulant l'expression des miR-132 et miR-212, ou inversement, que les stress causés répriment les voies de signalisation induites par le LPS et menant à l'induction de ces miRNAs. Afin de déterminer si les stress induits par la nucléofection pouvaient être responsables d'une activité élevée du promoteur putatif dans les cellules contrôles ou d'une perturbation de la réponse cellulaire au LPS, nous avons quantifié par PCR en temps réel l'expression des miR-132 et miR-212 dans des cellules nucléofectées puis stimulées au LPS. Comme l'illustre la figure 3.19, l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS est maintenue après que les cellules aient été nucléofectées. Néanmoins, ces miRNAs sont également surexprimés dans les cellules contrôles nucléofectées par rapport aux cellules non nucléofectées, ce qui suggère que le processus de transfection pourrait activer des facteurs de transcription jouant un rôle dans leur expression. On pourrait donc émettre l'hypothèse que l'absence de différence d'activité luciférase entre les cellules contrôles et stimulées au LPS transfectées par la construction rapportrice soit liée (i) à l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression des miR-132 et miR-212, suite aux stress engendrés par la nucléofection et (ii) à l'absence d'une conformation nucléosomale de la région promotrice putative clonée dans le plasmide rapporteur, qui pourrait dans le contexte endogène réprimer la transcription de ces miRNAs en absence de stimulation.

VI. Etude de l'expression de deux cibles du miR-132 : SirT1 et p300

Si le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212 reste encore peu connu (en dehors de cette étude, ce sujet n'a été abordé que par deux équipes et uniquement dans le contexte neuronal (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005)), en revanche, plusieurs cibles de ces miRNAs ont été identifiées (voir Introduction, point II et tables 1.2 et 1.3) et proposent un aperçu des réponses biologiques dans lesquelles ces miRNAs pourraient être impliqués. Au cours de ce mémoire, nous avons considéré deux cibles du miR-132, SirT1 et p300, comme étant susceptibles de réguler la réponse des monocytes et macrophages au LPS. En effet, l'activité de ces protéines étant étroitement liée à celle de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes pro-inflammatoires, SirT1 et p300 constituent deux cibles intéressantes à étudier dans le contexte d'une stimulation au LPS de cellules monocytaires.

VI.1. Etude de l'abondance de SirT1

D'une part, il a été rapporté que le miR-132 réprimait l'expression de SirT1 dans les pré-adipocytes humains et qu'une diminution de l'expression de cette protéine était corrélée à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la transcription de gènes pro-inflammatoires. Ceci suggère l'existence d'un lien entre l'expression du miR-132, celle de la protéine SirT1 et l'inflammation (Strum et al., 2009). D'autre part, il a été rapporté par une autre équipe qu'à la fois l'abondance de l'ARNm, l'abondance protéique ainsi que l'activité de SirT1 étaient réprimées dans des macrophages de rats et de souris stimulés pendant 24h avec du LPS (100 ng/ μ l). De plus, les auteurs ont montré que ces observations étaient corrélées à une diminution de l'acétylation de p65 et de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Cependant, ils n'ont pas mis en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces observations (Shen et al., 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'induction du miR-132 pourrait contribuer à la répression de SirT1 observée dans les macrophages stimulés au LPS.

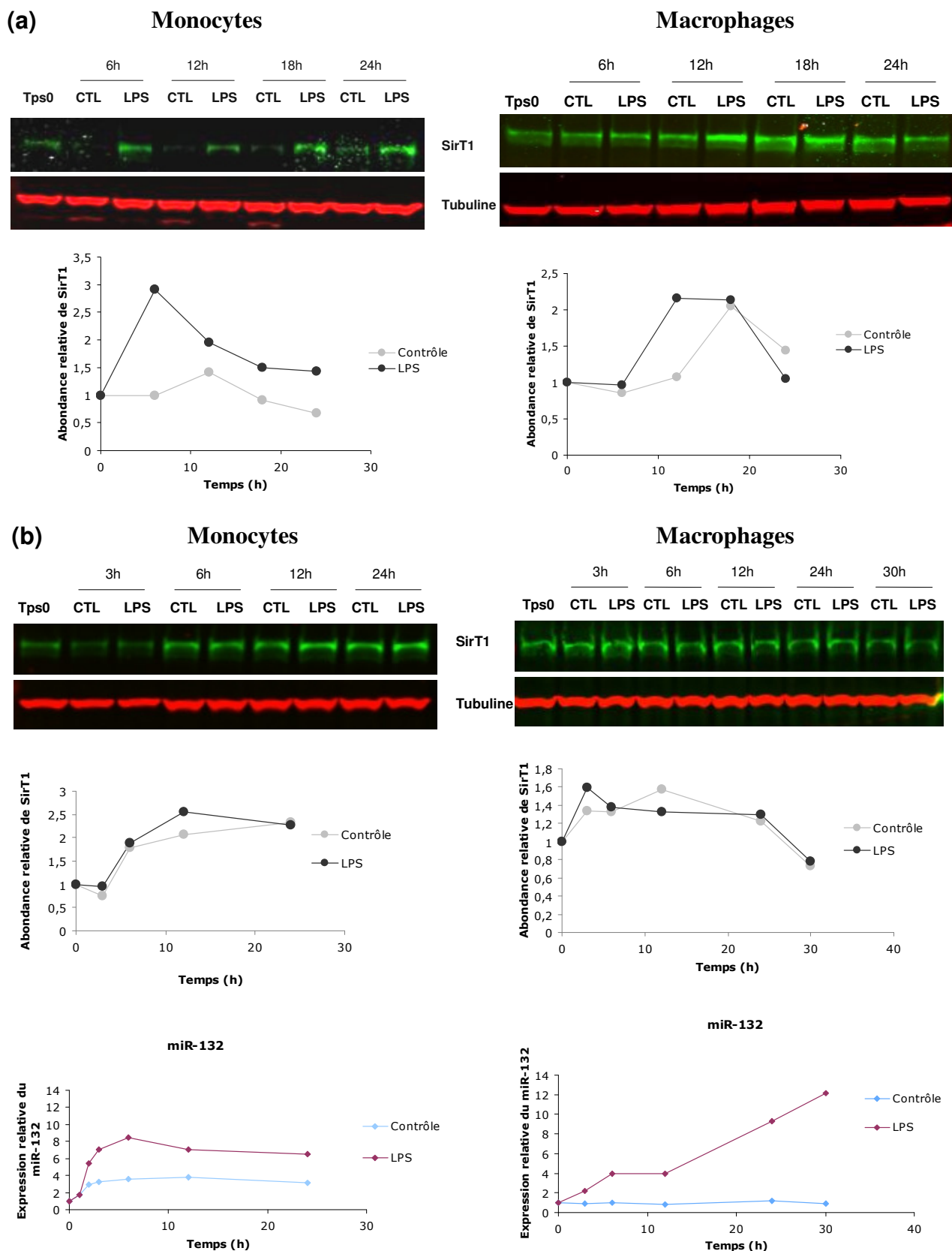


Figure 3.20 : Abondance de la protéine SirT1 dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS. Des monocytes et macrophages ont été stimulés avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS ou incubés dans du milieu base durant les temps indiqués avant que les protéines ne soient extraites et l'abondance de SirT1 déterminée par Western Blot (15 μg de protéines ont été engagées lors de la manipulation (a) en monocytes et 40 μg lors de la manipulation (a) en macrophages, et 25 μg lors de la manipulation (b)). Les graphes situés en dessous des Western Blots représentent la quantification de l'abondance relative de SirT1 normalisée à celle de l' α -tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimée par rapport au temps 0 (cellules dans du milieu complet). Les graphes intitulés « miR-132 » représentent l'expression de ce miRNA dans des boîtes sœurs de celles utilisées pour les extractions protéiques. Les figures (a) et (b) représentent deux manipulations indépendantes.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord voulu examiner le profil d'expression de SirT1 en réponse au LPS, de façon à déterminer s'il était susceptible d'être contrôlé par le miR-132. Le cas échéant, nous envisagions d'ensuite interférer avec l'abondance du miR-132 pour déterminer si cela affectait l'expression de SirT1. Etant donné que le miR-132 est induit dans les cellules stimulées au LPS, nous nous attendions, dans le cas où cette hypothèse serait correcte, à observer une diminution de l'abondance protéique de SirT1 dans ces cellules par rapport aux cellules non stimulées. Cependant, la figure 3.20a montre que l'abondance de SirT1 est dans la plupart des cas supérieure dans les cellules stimulées au LPS que dans les cellules contrôles. A partir des résultats obtenus lors de ces premières manipulations, nous avons émis l'hypothèse (voir document sur l'état d'avancement du mémoire présenté en juin 2010) que le contexte pro-inflammatoire pourrait induire rapidement l'expression de SirT1, qui serait ensuite réprimée par l'induction du miR-132. Cette hypothèse permettait d'expliquer le profil de décroissance de l'abondance de SirT1 dans les monocytes ainsi que le fait que l'abondance de SirT1 soit plus faible dans les macrophages stimulés au LPS que dans les macrophages contrôles après 24h de stimulation. Nous avons donc voulu reproduire ces résultats en veillant à établir en parallèle, dans des boîtes de culture sœurs, le profil d'expression du miR-132 en réponse au LPS (figure 3.20b). Néanmoins, nous avons observé au cours de ce réplicat des profils d'abondance de SirT1 très similaires dans les cellules contrôles et stimulées au LPS, caractérisés par une augmentation de l'abondance de SirT1 à la fois dans les cellules contrôles et stimulées par rapport au temps 0. Ceci suggère que la privation en sérum pourrait être responsable de l'augmentation de l'abondance relative de SirT1. Plusieurs données de la littérature supportent cette hypothèse ; il a en effet été démontré que la privation en sérum de cellules de rats et de plusieurs lignées cellulaires humaines induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm et de l'abondance protéique de SirT1 (Shang et al., 2009, Nemoto et al., 2004). Il est toutefois important de noter que la mise en évidence de SirT1 en tant que cible du miR-132 a été réalisée dans des pré-adipocytes et adipocytes humains privés en sérum, dans lesquels les auteurs ont observé une diminution de l'abondance de SirT1 liée à la surexpression du miR-132 dans ces conditions (Strum et al., 2009).

La figure 3.20b montre que l'abondance de SirT1, même lors des plus longs temps de stimulation, n'est pas diminuée dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles et ce, malgré l'induction importante du miR-132 dans des cellules stimulées en parallèle. Il ne semble donc pas que le miR-132 réprime l'expression de SirT1 dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. Cette observation implique qu'un même miRNA pourrait réprimer l'expression d'une cible dans certains types cellulaires en particulier, et pas dans d'autres, malgré qu'ils expriment la protéine cible. L'équipe de Wibrand a d'ailleurs rapporté qu'aucune modification de l'abondance des protéines MeCP2 et p250 GAP (deux cibles rapportées du miR-132) n'était observée durant la potentialisation à long terme du dentus gyratus, alors même que le miR-132 est induit de façon significative dans ces conditions (voir Introduction, point II.2.b) (Wibrand et al., 2010). L'impact de l'expression des miRNAs sur le protéome dépendrait donc des types cellulaires et des conditions de stimulation.

VI.2. Etude de l'abondance de p300

Il a été démontré dans des cellules endothéliales lymphatiques primaires humaines que le miR-132 (dont l'expression est induite suite à l'infection de ces cellules par le virus KSHV) réprimait l'expression de p300 et que la répression de p300 (par transfection de siRNA)

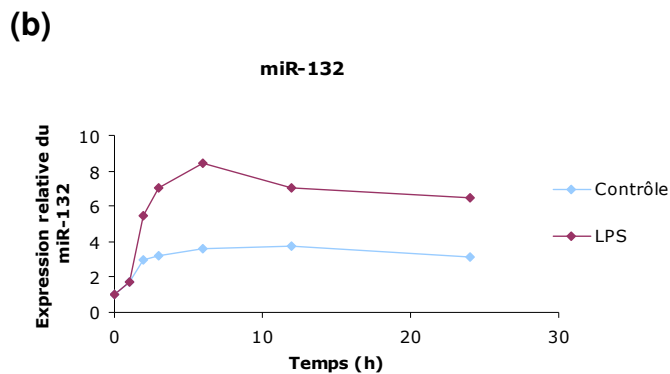
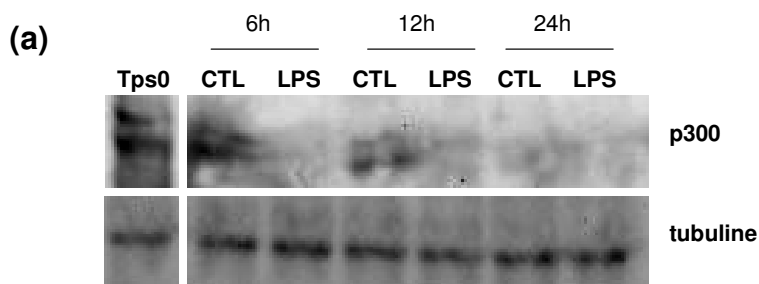


Figure 3.21 : Abondance de la protéine p300 dans les monocytes stimulés au LPS. (a) Des monocytes ont été stimulés avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS ou incubés dans du milieu base durant les temps indiqués avant que les protéines ne soient extraites et l'abondance de p300 déterminée par Western Blot. En raison d'une tâche sur la membrane, les pistes correspondant aux conditions 3h contrôle et 3h LPS ont été découpées. (b) L'abondance du miR-132 (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel, réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques provenant de boîtes de culture sœurs de celles utilisées pour les extractions protéiques.

induisait une diminution de l'expression du miR-132. Ces observations suggèrent l'existence d'une boucle de rétro-action entre le miR-132 et le co-activateur transcriptionnel p300, qui pourrait expliquer la nature transitoire de l'induction du miR-132 dans les LEC infectées par le KSHV (Lagos et al., 2010). Etant donné que la cinétique d'induction du miR-132 dans cette étude est similaire à celle observée dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS (on observe dans les deux cas un pic d'induction du miR-132 après 6h de stimulation, suivi d'une très légère diminution de son abondance lors des temps plus longs), nous avons émis l'hypothèse qu'une telle boucle de régulation pourrait expliquer le profil d'expression du miR-132 dans les cellules THP-1. Cette cible est d'autant plus intéressante à étudier dans le contexte pro-inflammatoire de stimulation au LPS des cellules THP-1 qu'elle interagit avec de nombreuses sous-unités de facteurs de transcription orchestrant les réponses inflammatoires (dont NF- κ B, AP-1 et CREB) (Vo and Goodman, 2001).

Afin de déterminer si le miR-132 réprime l'expression de p300 dans les cellules THP-1, nous avons étudié son abondance dans des cellules stimulées ou non au LPS. La figure 3.21 illustre les résultats obtenus à partir d'extraits protéiques totaux de monocytes. Bien que la détection par Western Blot de p300 soit de mauvaise qualité (plusieurs optimisations relatives au type d'extraction protéique, aux conditions de transfert et de marquage ne nous ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats) et qu'il serait nécessaire d'améliorer la détection de cette protéine, il est possible de deviner une abondance réduite de p300 dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. De plus, l'abondance de p300 semble également réduite dans les cellules privées en sérum par rapport aux cellules placées dans du milieu complet. Ces observations, qui nécessitent d'être confirmées dans d'autres réplicats, nous laissent spéculer que le miR-132 pourrait réprimer le co-activateur transcriptionnel p300 dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS et dans une moindre mesure, dans les monocytes privés en sérum. Si la corrélation inverse entre l'abondance du miR-132 et celle de p300 était confirmée, il serait intéressant de modifier l'abondance du miR-132 (par transfection d'« anti-miR » ou de « mimics ») et d'analyser les effets de ces modifications sur l'abondance de p300 (ainsi que sur l'activité d'un rapporteur luciférase couplé à la 3'UTR de cette protéine) de façon à valider cette hypothèse.

Conclusions et perspectives

Au cours de ce mémoire, nous avons démontré que les miR-132 et miR-212 étaient tous deux induits lors de la stimulation au LPS de monocytes et de macrophages de la lignée humaine THP-1 ainsi que, dans une moindre mesure, lors de la privation en sérum de monocytes. L'étude des cinétiques d'induction des miR-132 et miR-212 dans les monocytes et macrophages nous a amené à émettre l'hypothèse que ces deux miRNAs pourraient être transcrits de façon polycistronique. En effet, les courbes d'expression de ces deux miRNAs présentent des profils très similaires. Après avoir démontré pour la première fois l'existence d'une forme primaire commune aux miR-132 et miR-212 humains, nous avons caractérisé son expression dans les cellules stimulées au LPS. Ces études ont montré que l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS est maximale après 3h de stimulation dans les monocytes et macrophages et diminue ensuite fortement après 6h de stimulation. Cependant, alors que l'expression du pri-miR-132/212 retourne à un niveau quasiment basal au-delà de 6h de stimulation dans les monocytes, elle reste relativement élevée dans les macrophages jusqu'à plus de 30h de stimulation. Ceci pourrait expliquer l'induction continue des formes matures au-delà de 30h de stimulation dans ces cellules.

L'étude de l'expression du pri-miR-132/212 en présence d'un inhibiteur de la transcription nous a permis de démontrer que des mécanismes transcriptionnels étaient responsables de l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 en réponse à une stimulation au LPS des cellules THP-1. Afin d'identifier des facteurs de transcription responsables de cette réponse, nous avons réalisé une étude bioinformatique de la région génomique située à proximité des miR-132 et miR-212. Cette analyse nous a permis d'identifier des sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la transcription de gènes en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, comme AP-1, NF- κ B et CREB. Etant donné qu'Aurélien Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a montré que l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription était augmentée dans les cellules THP-1 stimulées au LPS, nous avons voulu tester le rôle potentiel de ces trois candidats dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS.

Afin d'étudier le rôle d'AP-1 dans la transcription des miRNAs, nous avons utilisé un inhibiteur de JNK, le SP 600125. Cependant, les effets aspécifiques de cet inhibiteur et plus particulièrement son effet possible sur la phosphorylation de CREB ne nous permettent pas de tirer de conclusions quant à l'éventuelle importance d'AP-1 dans l'expression des miR-132 et miR-212. L'utilisation de siRNA est généralement indiquée pour réprimer de façon plus spécifique l'expression d'une cible particulière et pourrait donc se révéler plus judicieuse que l'utilisation d'un inhibiteur chimique. Cependant, étant donné que la famille AP-1 comporte de nombreux membres, cette approche nécessiterait probablement la transfection simultanée de multiples siRNA contre différents membres pour être efficace. Une telle approche a notamment été suivie par l'équipe de Ma, qui a co-transfecté des siRNA contre c-Fos et c-Jun dans des cellules THP-1 de façon à mettre en évidence le rôle d'AP-1 dans la transcription du gène de l'IL-12p40 en réponse au LPS (Ma et al., 2004). Nakayama et son équipe ont également, bien que dans un autre contexte réalisé des doubles répressions de membres de la famille AP-1 (Nakayama et al., 2008). Une alternative à la transfection de siRNA consisterait en la transfection de plasmides encodant des dominants négatifs d'AP-1. Des auteurs ont notamment rapporté l'utilisation de dominants négatifs de c-Jun (Tam-67, qui ne comporte pas le domaine majeur de transactivation de c-Jun) et de c-Fos (A-Fos, dont le site de liaison à l'ADN a été modifié de façon à se complexer de façon stable avec c-Jun et à en empêcher la liaison à l'ADN) dans le but de démontrer l'importance d'AP-1 dans la transcription de gènes d'intérêt (Irrarazabal et al., 2008, Olive et al., 1997). Etant donné que la nucléofection des cellules THP-1 ne semble pas affecter l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS

(contrairement à l'utilisation de Lipofectamine 2000), il serait intéressant de tester l'une de ces approches (siRNA ou dominants négatifs) en nucléofectant les cellules afin de vérifier si AP-1 semble réguler l'expression des miR-132 et miR-212.

Dans le but d'étudier les rôles potentiels de NF- κ B et CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212, nous avons transfecté des macrophages THP-1 avec des siRNA spécifiques de p65 et de CREB à l'aide de Lipofectamine 2000. Cependant, l'analyse de l'expression de ces miRNAs nous a montré que l'incubation des cellules en présence de cet agent de transfection seul perturbait leur expression. Il serait donc intéressant de reproduire ces manipulations en nucléofectant les cellules, étant donné que les résultats présentés à la figure 3.19 montrent que cette technique de transfection ne semble pas altérer l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. En outre, il serait judicieux, en plus de confirmer l'efficacité de la répression en analysant l'abondance totale de ces facteurs de transcription, d'étudier l'effet de ces répressions sur l'abondance des formes modifiées (phosphorylées/acétylées) et nucléaires de ces facteurs de transcription, sur leur activité de liaison à l'ADN ou encore sur leur capacité à transactiver un plasmide rapporteur. Bien que ces études ne reflètent pas toutes directement l'activité du facteur de transcription étudié, elles nous permettraient tout de même de mieux approcher l'effet de la transfection de siRNA sur l'activité du facteur de transcription ciblé que l'étude de sa forme totale.

Au cours des manipulations réalisées en présence d'inhibiteurs de MSK1, nous avons mis en évidence que le H-89 permettait de réprimer complètement la phosphorylation de CREB résultant de la stimulation au LPS des cellules THP-1 et inhibait fortement la transcription du pri-miR-132/212 dans ces cellules. Bien que les effets du Ro-31-8220 soient moins marqués et que cette manipulation nécessite d'être reproduite, ces résultats suggèrent que CREB, dont le rôle dans la transcription des miR-132 et miR-212 a été démontré dans le contexte neuronal chez la souris et le rat (Vo et al., 2005, Remenyi et al., 2010), serait également impliqué dans le contrôle de l'expression des miR-132 et miR-212 humains en réponse au LPS. Il est néanmoins important de garder à l'esprit d'une part que les inhibiteurs utilisés ne sont pas spécifiques de la kinase MSK1 et d'autre part que cette kinase active d'autres facteurs que CREB (dont p65) et qu'elle joue également un rôle dans le remodelage de la chromatine.

Au cours de ce mémoire, nous avons développé une seconde approche afin d'étudier les acteurs participant à la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212. Nous avons construit un plasmide rapporteur contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212. Cependant, la transfection de cette construction dans les cellules THP-1 ne nous a pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité du promoteur putatif cloné dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. Bien que plusieurs hypothèses puissent expliquer l'absence d'induction de l'activité du gène rapporteur dans les cellules stimulées au LPS (voir Résultats et discussion, point V.3.b), il serait intéressant de cloner dans le plasmide rapporteur une région élargie du promoteur putatif choisi au cours de cette étude, englobant la région située entre les pre-miR-212 et pre-miR-132. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, toute une série de sites de liaison putatifs pour différents régulateurs transcriptionnels (Sp1, Kid3, ETF, CREB, REST) situés entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 présentent un ordre conservé chez l'homme et la souris. L'équipe de Remenyi, qui a étudié le rôle de CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines dans des neurones corticaux murins, a mis en évidence l'importance de trois sites CREB dans l'expression de ces miRNAs, dont l'un d'eux est situé entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 (Remenyi et al., 2010). Bien que le rôle de ce site en particulier n'ait pas été démontré (les chercheurs ont uniquement démontré qu'il n'y avait plus d'induction

des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines lorsque les trois sites étaient mutés), il se pourrait qu'il soit important dans l'expression des miR-132 et miR-212 étant donné qu'il est lié par CREB dans les neurones corticaux de rats (Vo et al., 2005).

Par ailleurs, nous avons remarqué qu'un site de liaison putatif pour le répresseur REST était totalement conservé chez l'homme et la souris et situé entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 (voir Annexe 3). Or, ce site, long de 19 pb, représente le plus long site conservé entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 humains et murins, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle important. Le répresseur transcriptionnel REST réprime l'expression de gènes neuronaux dans les cellules non-neuronales par différents mécanismes. Il peut bloquer l'assemblage des facteurs de transcription au niveau du promoteur principal ou interagir avec des co-répresseurs recrutant des histones désacétylases modifiant la structure de la chromatine au niveau de ses gènes cibles (Plaisance et al., 2005, Wu and Xie, 2006). Lors de la différenciation des cellules neuronales, ce répresseur est ubiquitinylé par l'E3 ubiquitine ligase SCF^{βTRCP} et dégradé par protéolyse, ce qui permet l'expression de ses gènes cibles (Westbrook et al., 2008). Outre le fait qu'un site putatif de liaison pour REST soit conservé chez l'homme et la souris (nous n'avons comparé que ces deux organismes au cours de ce mémoire ; cependant, des analyses bioinformatiques focalisées sur les sites de liaison du répresseur REST ont mis en évidence que ce site (situé à proximité du miR-132), était également conservé chez le rat et le chien (Wu and Xie, 2006)), d'autres arguments sont en faveur d'un rôle potentiel de ce répresseur transcriptionnel dans le contrôle de l'expression des miR-132 et miR-212. En effet, le site de liaison pour ce répresseur transcriptionnel a été expérimentalement validé dans des cellules non-neuronales murines (Conaco et al., 2006) et de nombreuses études concernant les miR-132 et miR-212 relèvent d'un contexte neuronal (voir Introduction, point II.2.b). Il pourrait donc se révéler utile de cloner dans une construction rapportrice le site de liaison pour ce répresseur transcriptionnel, afin de déterminer s'il est important pour ne garantir qu'une expression basale des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 non stimulées. Étant donné que REST réprime l'expression de ses gènes cibles notamment en modifiant la structure de la chromatine, l'utilisation d'un plasmide rapporteur classique transfecté de façon transitoire dans les cellules semble peu adaptée. En effet, l'utilisation d'un tel plasmide ne permettrait pas de mettre en évidence les effets de REST s'ils sont dépendants de modifications des histones. En revanche, il existe des plasmides épisomaux réplcatifs qui adoptent une structure nucléosomale se rapprochant de la structure de la chromatine *in vivo*. Ce type de plasmide a notamment été utilisé par des chercheurs ayant démontré que REST réprimait une de ses cibles en induisant la désacétylation des histones associées à sa séquence promotrice (Pinnoji et al., 2007). Une seconde démarche afin d'étudier le rôle potentiel de REST dans l'expression des miR-132 et miR-212 humains consisterait en la vérification de sa capacité à lier le site situé entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 par immunoprécipitation de chromatine dans les cellules THP-1 stimulées ou non au LPS. Si la présence de ce répresseur était confirmée, on pourrait alors émettre l'hypothèse que REST soit impliqué dans la faible expression des miR-132 et miR-212 en condition basale. De nombreuses études portant sur le rôle répresseur de REST font appel à la transfection de plasmides exprimant REST ou des dominants négatifs de ce répresseur (Pinnoji et al., 2007, Plaisance et al., 2005, Lietz et al., 2003, Ogawa et al., 2002, Garcia-Sanchez et al., 2003). Il pourrait donc être intéressant d'appliquer cette troisième démarche dans les cellules THP-1 et d'analyser les effets de ces transfections soit sur l'expression des miR-132 et miR-212 endogènes, soit sur l'activité d'un plasmide rapporteur dans lequel serait clonée une version élargie de la région promotrice putative étudiée au cours de ce mémoire. Une autre approche couramment utilisée afin de mettre en évidence le rôle de REST dans la répression d'un gène cible potentiel consiste à traiter les cellules avec de la

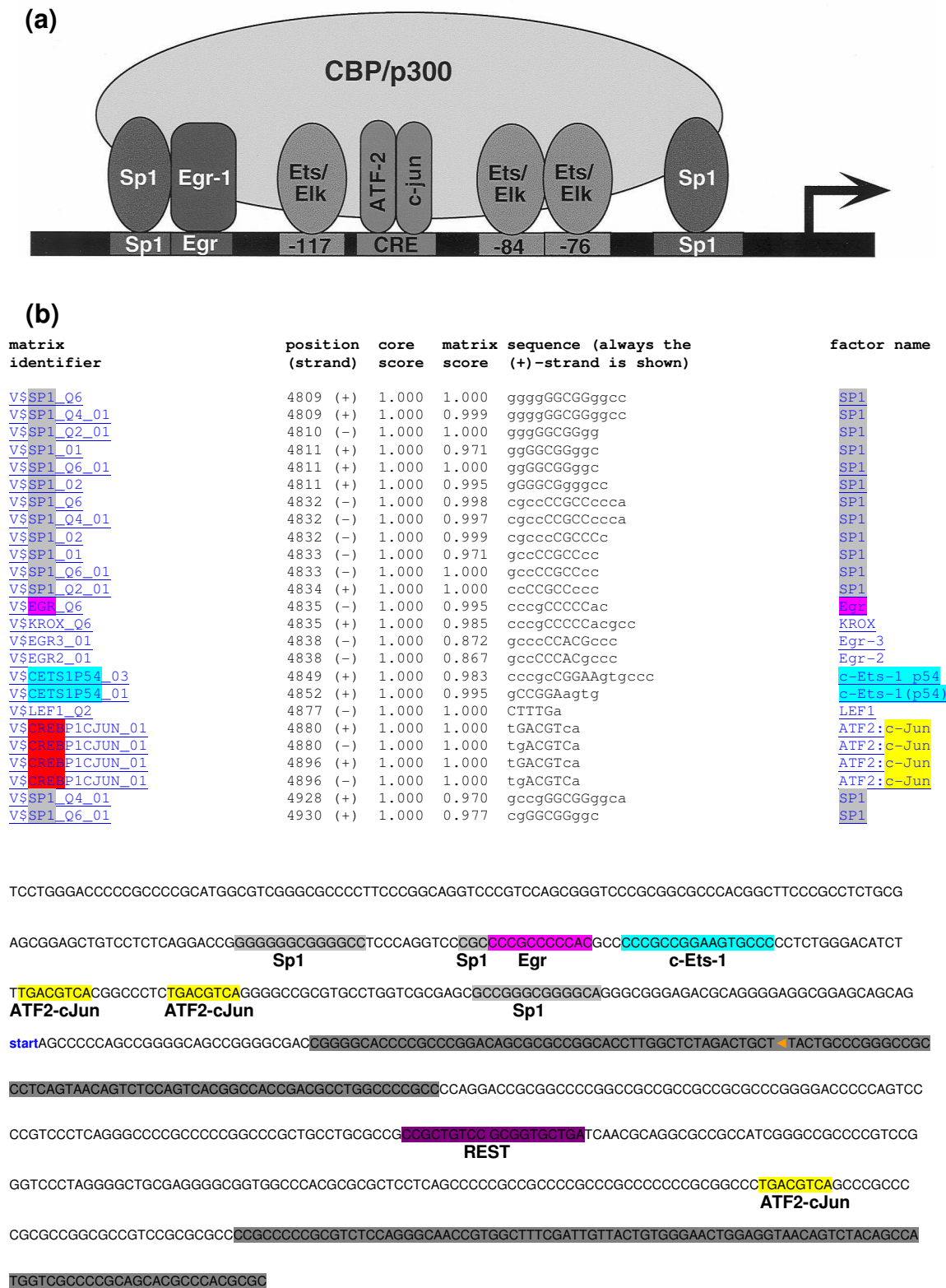


Figure 4.1 : Modèle préposé de formation d'un complexe enhancer. (a) Modélisation du complexe enhancer assurant l'induction de l'expression du TNF- α dans les macrophages murins et humains stimulés au LPS (Tsai, Falvo et al. 2000). (b) Détection et localisation de sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription identiques dans la région promotrice putative des miR-132 et miR-121. Cette figure illustre une partie des sites de liaison putatifs identifiés lors de l'analyse bioinformatique de la région génomique encodant les miR-132 et miR-121 à l'aide du logiciel Transfac (matrice cellules immunes ; option minimisant les faux positifs ; les résultats complets de cette analyse sont présentés en annexe 1) ainsi que leur emplacement sur la séquence génomique encodant les pre-miR-121 (séquence surlignée en gris foncé du dessus - amont) et pre-miR-132 (séquence surlignée en gris foncé en dessous - aval). Le sigle « start » en bleu indique un site d'initiation de la transcription identifié par l'équipe de Wang (Wang, Wang et al. 2010) tandis que la flèche orange indique l'extrémité aval de la région promotrice putative clonée dans un plasmide rapporteur au cours de ce mémoire. Les sites de liaison putatifs pour ATF2-cJun correspondent aux sites CRE conservés chez l'homme et la souris. Le site de liaison putatif pour REST, également conservé chez l'homme et la souris, est aussi indiqué.

trichostatine A, un inhibiteur d'histones désacétylases de type I et II. Dans ce cas également l'effet de cet inhibiteur pourrait être analysé soit sur l'expression des miRNAs, soit sur l'activité d'une région promotrice clonée dans un vecteur épisomal, comme cela a été rapporté par l'équipe de Pinnoji (Pinnoji et al., 2007).

Outre les facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et CREB sur lesquels nous nous sommes concentrés au cours de ce mémoire, d'autres facteurs de transcription pourraient participer à l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Nous discuterons au cours des trois paragraphes suivants le rôle de certains facteurs de transcription candidats qu'il pourrait être intéressant d'investiguer au cours de futures recherches.

De nombreux sites de liaisons putatifs pour le facteur de transcription ETF sont détectés dans la région génomique située à proximité des miR-132 et miR-212. Lors de l'analyse bioinformatique réalisée à l'aide du logiciel Transfac décrite précédemment (Résultats et discussion, point IV.1) et dont les résultats sont présentés en annexe 1 (analyse réalisée avec la matrice « vertébrés minimisant les faux positifs »), 15 sites putatifs pour ETF ont été identifiés, dont 6 sont intégrés dans la construction réalisée au cours de ce mémoire, 4 se trouvent en amont de la région clonée et 5 en aval, entre les pre-miR-132 et pre-miR-212. Ce facteur de transcription pourrait être important dans l'expression des miR-132 et miR-212 dans la mesure où il est connu pour activer des promoteurs riches en GC (Kageyama et al., 1989). Or, les miR-132 et miR-212 se trouvent sous le contrôle de ce type de promoteur.

Le rôle putatif du facteur de transcription Sp1 dans la transcription des miR-132 et miR-212 pourrait également être étudié. En effet, les résultats des analyses bioinformatiques illustrés en annexe 1 montrent la présence de nombreux sites putatifs pour le facteur de transcription Sp1 (7 lorsque la matrice « vertébrés non redondants » est sélectionnée et 46 sur les 156 sites identifiés lorsqu'on sélectionne la matrice « cellules immunes »). Or, il a été démontré que Sp1 jouait un rôle clé dans la transcription des gènes cibles de REST dans les cellules dans lesquelles REST est absent (Plaisance et al., 2005). Par ailleurs, bien que la présence de nombreux sites de liaison pour Sp1 constitue une caractéristique générale des promoteurs riches en GC, il a été rapporté dans une étude de protéomique quantitative que l'abondance nucléaire de Sp1 était augmentée de 1,5 fois dans des macrophages murins stimulés au LPS (Du et al., 2010). De plus, Sp1 participe à l'induction du gène encodant le TNF- α en réponse au LPS (Tsai et al., 2000). En effet, des chercheurs ont mis en évidence qu'un complexe enhancer composé des facteurs Sp1, Egr-1 (early growth response factor-1), Ets/Elk, ATF2-c-Jun et CBP/p300 (ce complexe enhancer est représenté à la figure 4.1a ci-contre) contrôlait l'induction du TNF- α en réponse à une stimulation au LPS de macrophages murins et humains. Sp1 est généralement considéré comme un facteur de transcription constitutif ; cependant, ces chercheurs ont mis en évidence que la transcription du gène encodant le TNF- α lors d'une stimulation au LPS impliquait une liaison inductible du facteur de transcription Sp1 au promoteur de ce gène. Selon les auteurs, cette liaison inductible pourrait être permise suite à des modifications post-traductionnelles de Sp1 ou suite à des modifications de l'accessibilité de ces sites résultant d'un remodelage de la chromatine.

Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de remarquer que les sites de liaison des facteurs contribuant à la formation de l'élément enhancer décrit ci-dessus sont également présents, bien que dans une configuration légèrement différente, en amont du pre-miR-212 et d'un des sites putatifs d'initiation de la transcription identifié au cours d'une analyse bioinformatique (figure 4.1b). Les différents facteurs de transcription formant ce complexe enhancer semblent donc être des candidats assez pertinents à étudier dans le cadre de

l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Il a d'ailleurs été démontré que la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (ainsi que de monocytes primaires) induisait une augmentation de l'expression de Egr-1, lequel induirait ensuite l'expression du TNF- α et du TF (tissue factor) (Guha et al., 2001, Group and Donovan-Peluso, 1996). L'induction de ce facteur de transcription dans les cellules stimulées au LPS dépend de l'activation du facteur Elk-1, qui est phosphorylé en aval de la voie MEK-ERK1/2 après seulement 15 min de stimulation. Il est intéressant de noter que l'abondance protéique du facteur Egr-1 est maximale après 2h de stimulation au LPS, diminue après 4h de stimulation pour ensuite retourner à un niveau basal lors des plus long temps de stimulation (Guha et al., 2001). La cinétique d'expression de ce facteur de transcription est donc compatible avec un rôle putatif de celui-ci dans l'induction du pri-miR-132/212. Par ailleurs, au cours de leur étude dans des neurones corticaux murins, l'équipe de Remenyi a mis en évidence qu'un inhibiteur de MEK inhibait complètement l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines, alors qu'une induction résiduelle de ces miRNAs était observée dans des cellules dépourvues de MSK1/2 (Remenyi et al., 2010). Ceci suggère que les kinases ERK1/2 réguleraient l'expression des miR-132 et miR-212 via un mécanisme indépendant de l'activation de MSK1/2 et de la phosphorylation de CREB. Si l'incubation de cellules THP-1 avec un inhibiteur de MEK inhibait également l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS, on pourrait spéculer que l'expression de ces miRNAs soit en partie dépendante de l'induction du facteur Egr-1 dans les cellules stimulées au LPS. D'autre part, les protéines de la famille Ets (dont font partie entre autres Ets-1, Ets-2, Elk et PU.1) sont connues pour réguler l'expression des gènes inflammatoires (Chung et al., 2005, Sweet and Hume, 1996). L'étude de leur rôle potentiel (plus particulièrement celui de Ets-1 étant donné la présence d'un site de liaison putatif en amont du pre-miR-212) dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS pourrait donc être justifiée. Par ailleurs, il est assez surprenant de remarquer que les deux sites de liaison pour les dimères ATF2-c-Jun situés en amont du pre-miR-212 et illustrés à la figure 4.1b correspondent aux deux des trois sites CRE identifiés par l'équipe de Remenyi (voir l'alignement des séquences humaines et murines en annexe 3) et particulièrement importants pour l'expression des miR-132 et miR-212 murins (Remenyi et al., 2010). Au vu (i) des similitudes de la région enhancer du TNF- α et de la séquence située en amont du pre-miR-212 et (ii) des données de la littérature concernant les facteurs formant ce complexe enhancer, il serait intéressant de vérifier s'ils lient leurs sites putatifs prédits dans la région promotrice des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. En outre, étant donné que la région enhancer précédemment décrite suffit à l'induction maximale de l'expression du TNF- α en réponse au LPS, il serait intéressant de vérifier si la région similaire détectée dans le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 suffit également à leur expression. Au vu du rôle potentiel que pourrait jouer REST dans le maintien d'une transcription basale et au vu des interactions existant entre REST, Sp1 et le remodelage de la chromatine, il serait opportun de tester cette hypothèse en analysant l'activité d'une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 incluant le site putatif de ce répresseur et clonée dans un plasmide réplcatif épisomal.

Les nombreuses hypothèses décrites au cours de ce mémoire à propos du rôle putatif de certains facteurs de transcription dans l'expression des miR-132 et miR-212 ont été élaborées à partir des résultats d'analyses bioinformatiques. En effet, ces analyses représentent à l'heure actuelle la première approche permettant de déterminer quels régulateurs transcriptionnels pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de gènes dont la séquence régulatrice n'est pas encore décrite. Cependant, ces approches présentent le désavantage d'une part de générer un nombre très important de candidats (en annexe n'ont été présentés que les résultats des analyses bioinformatiques réalisées à l'aide du logiciel Transfac en sélectionnant l'option

minimisant les faux positifs ; lorsque l'option minimisant les faux négatifs est privilégiée, plusieurs milliers de sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription sont identifiés) et d'autre part de ne pas tenir compte du contexte cellulaire dans lequel le gène d'intérêt est analysé. La combinaison des résultats fournis par ce type d'approche avec la connaissance du contexte biologique dans lequel le gène d'intérêt est exprimé constitue un des moyens de sélectionner des candidats *à priori* plus susceptibles que d'autres de jouer un rôle dans son expression. Des validations expérimentales sont ensuite nécessaires afin de confirmer les rôles de ces régulateurs transcriptionnels dans le contexte étudié. Au cours de ce mémoire, nous avons testé le rôle des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et CREB via l'utilisation d'inhibiteurs chimiques et de siRNA. Ces études se sont révélées peu concluantes étant donné les limitations de ces techniques (les inhibiteurs chimiques sont rarement spécifiques, tandis que la transfection de siRNA exige un taux de transfection élevé pouvant perturber les réponses cellulaires). Comme suggéré précédemment, une approche alternative consisterait en la transfection de dominants négatifs de ces facteurs de transcription (ainsi que d'autres facteurs candidats). La réalisation d'une construction rapportrice encodant une région promotrice putative ou des versions tronquées ou mutées de celle-ci est une démarche couramment utilisée afin de valider la fonction de certains facteurs de transcription dans l'expression de gènes d'intérêt, que nous aimerions poursuivre dans le cadre de futures recherches.

Dans un contexte plus général que celui de l'étude réalisée au cours de ce mémoire, d'autres approches ont également été développées dans le but de confirmer la capacité de facteurs de transcription à lier une séquence d'ADN d'intérêt. L'EMSA (electrophoretic mobility shift assay, ou retard sur gel) par exemple consiste à faire migrer en conditions non dénaturantes des sondes d'ADN marquées, préalablement incubées ou non en présence d'extraits protéiques et à ensuite comparer les profils de migration. Cette technique permet, via la visualisation d'un « retard de migration sur le gel » de mettre en évidence la liaison de protéines à une séquence oligonucléotidique d'intérêt. L'identité de ces protéines peut être révélée en incubant les sondes d'ADN en présence à la fois d'extraits protéiques et d'anticorps reconnaissant un facteur de transcription candidat (« supershift ») (Laniel et al., 2001). L'empreinte aux nucléases est une seconde technique permettant l'identification de sites liés par des protéines au niveau d'une séquence oligonucléotidique d'intérêt. Cette technique, basée sur la protection de l'ADN conférée par un facteur de transcription lorsqu'il se lie à celui-ci, présente l'avantage de localiser assez précisément le site lié par un facteur de transcription (Galas and Schmitz, 1978). Au laboratoire est développée une technique d'identification sans *à priori* des facteurs de transcription liés à une séquence oligonucléotidique d'intérêt. Cette technique, qui combine les méthodes de chromatographie d'affinité et de spectrométrie de masse, pourrait être utilisée au cours de futures recherches dans le but de valider la liaison de facteurs de transcription à une portion de la région promotrice des miR-132 et miR-212. Toutefois, cette technique, tout comme les deux précédentes, repose sur l'utilisation de sondes nucléotidiques et ne permet donc de mettre en évidence que des interactions ADN/protéines se déroulant *in vitro*. À l'inverse, l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) assure l'identification de séquences liées par des facteurs de transcription *in vivo* et tient donc compte à la fois des conditions cellulaires expérimentales et de l'environnement chromatinien des séquences liées. Cette technique est cependant parfois difficile à mettre en place et ne peut raisonnablement être développée que pour un nombre restreint de candidats.

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'abondance de deux cibles décrites du miR-132, SirT1 et p300, dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Ces études s'inscrivent dans le

contexte général du contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212 étant donné que SirT1 et p300 interagissent avec différents facteurs de transcription « clés » des réponses inflammatoires et pourraient donc jouer un rôle dans l'expression de ces miRNAs. Les résultats des études concernant SirT1 suggèrent que le miR-132 ne réprimerait pas cette protéine dans les cellules THP-1. Il semble donc, comme cela a déjà été suggéré, qu'un miRNA puisse exercer des effets différents sur le protéome selon les types cellulaires et le contexte étudié. L'étude de l'abondance de p300 dans des monocytes stimulés au LPS nécessite d'être reproduite et améliorée au niveau de la détection ; cependant, nos premiers résultats pourraient être en accord avec un effet répressif du miR-132 sur l'abondance de cette protéine. Si la corrélation inverse entre l'abondance du miR-132 et celle de p300 était confirmée, nous pourrions tenter de valider cette hypothèse en modifiant l'abondance du miR-132 (par transfection d'« anti-miR » ou de « mimics ») et en analysant les effets de ces modifications sur l'abondance de p300 ainsi que sur l'activité d'un rapporteur luciférase couplé à la 3'UTR de cette protéine.

En conclusion, une des perspectives immédiates de ce mémoire pourrait consister en le clonage d'une nouvelle région promotrice putative des miR-132 et miR-212, incluant la région située entre les pre-miR-212 et pre-miR-132, dans un vecteur répliquatif épisomal adoptant une configuration nucléosomale proche de la structure chromatinienne endogène. La présence d'une telle conformation pourrait en effet être importante à la fois pour le maintien d'une transcription basale en absence de stimulation ainsi que pour l'induction de l'activité du promoteur en condition de stimulation. Si cette construction, une fois transfectée dans les cellules THP-1, était associée à une augmentation de l'activité du promoteur putatif cloné dans les cellules stimulées au LPS, il serait alors possible de tester le rôle potentiel de plusieurs facteurs de transcription (CREB, AP-1, NF- κ B, Sp1, Egr et Ets, ainsi que le répresseur REST), par différentes approches. Tout d'abord, il serait intéressant de réaliser des versions tronquées de ce promoteur, de façon à localiser la région minimale permettant de conserver l'induction en réponse au LPS. Ensuite, le rôle putatif de plusieurs facteurs de transcription pourrait être évalué en nucléofectant des siRNA ou des plasmides encodant des dominants négatifs spécifiques de ces facteurs. Les effets de ces nucléofections pourraient être analysés aussi bien sur l'expression des miRNAs endogènes (dans des cellules non transfectées par la construction rapportrice) que sur l'activité du promoteur cloné dans un plasmide rapporteur. Inversement, le rôle de certains acteurs (comme REST) pourrait être testé en transfectant des plasmides permettant leur surexpression. Dans un second temps, le rôle de facteurs de transcription candidats pourrait être validé en réalisant des mutations ponctuelles dans les sites qu'ils sont susceptibles de lier et en observant si une diminution de l'activité du promoteur est associée à ces mutations. Enfin, des immunoprécipitations de chromatine pourraient être réalisées de façon à confirmer la liaison physique de facteurs de transcription d'intérêt à la séquence promotrice endogène.

Avant de conclure, il semble important de souligner qu'au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que celle de leur forme primaire dans des monocytes de la lignée cellulaire THP-1 ainsi que dans des macrophages différenciés *in vitro*. Bien que ce modèle fournisse une série d'avantages techniques (disponibilité d'un grand nombre de cellules étant donné leur capacité de multiplication *in vitro*, ...), il s'avère que l'expression de certains gènes est différente dans les cellules issues de lignées par comparaison avec des cellules primaires (Kohro et al., 2004). Néanmoins, il a été mis en évidence que la stimulation au LPS de macrophages humains primaires (durant 24h avec une concentration identique en LPS que celle utilisée au cours de ce mémoire) induisait une augmentation de l'expression du miR-132 de cinq fois par rapport aux cellules contrôles

(Shaked et al., 2009), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle l'expression des miR-132 et miR-212 serait très semblable dans les cellules THP-1 et les cellules primaires. Par ailleurs, Aurélie Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a mis en évidence que la stimulation de cellules THP-1 par de l'IL-1 β ainsi que par du TNF- α induisait également l'expression des miR-132 et miR-212. De plus, il a été observé au laboratoire que le miR-132 était induit dans des macrophages primaires humains infectés par le parasite *Leishmania major* (communication personnelle de Cindy Gustin - recherches réalisées dans le cadre du projet SysCo (Systematic Functional Analysis of Intracellular Parasitism as a Model of Genomes Conflict), URBC, FUNDP). Ceci démontre que l'expression des miR-132 et miR-212 est induite dans les macrophages non seulement par le LPS mais aussi, de façon plus générale, par le contexte pro-inflammatoire. Il est intéressant de noter que cette observation ne se limite pas *in vitro* et qu'elle semble avoir une relevance physiologique. En effet, l'équipe de Pauley a mis en évidence que le miR-132 est aussi surexprimé dans les monocytes et macrophages de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Pauley et al., 2008) (Introduction, point II.2.a). Il semble donc qu'un contexte pro-inflammatoire induise l'expression du miR-132 dans les monocytes et macrophages à la fois *in vitro* et *in vivo*. Une fois que les mécanismes transcriptionnels contrôlant l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 seront mieux connus, il serait donc intéressant de déterminer s'ils sont conservés dans des cellules primaires. De futures recherches seront également nécessaires afin de comprendre le rôle physiologique de l'induction de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire.

Bibliographie

- ALVAREZ-SAAVEDRA, M., ANTOUN, G., YANAGIYA, A., OLIVA-HERNANDEZ, R., CORNEJO-PALMA, D., PEREZ-IRATXETA, C., SONENBERG, N. & CHENG, H. Y. 2010. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet*.
- ANAND, S., MAJETI, B. K., ACEVEDO, L. M., MURPHY, E. A., MUKTHAVARAM, R., SCHEPPKE, L., HUANG, M., SHIELDS, D. J., LINDQUIST, J. N., LAPINSKI, P. E., KING, P. D., WEIS, S. M. & CHERESH, D. A. 2010. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med*, 16, 909-14.
- AUWERX, J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47, 22-31.
- BAIN, J., MCLAUCHLAN, H., ELLIOTT, M. & COHEN, P. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, 371, 199-204.
- BARROSO-DELJESUS, A., ROMERO-LOPEZ, C., LUCENA-AGUILAR, G., MELEN, G. J., SANCHEZ, L., LIGERO, G., BERZAL-HERRANZ, A. & MENENDEZ, P. 2008. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol*, 28, 6609-19.
- BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T. Y., SCHONES, D. E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. & ZHAO, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-37.
- BASKERVILLE, S. & BARTEL, D. P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, 241-7.
- BENNETT, B. L., SASAKI, D. T., MURRAY, B. W., O'LEARY, E. C., SAKATA, S. T., XU, W., LEISTEN, J. C., MOTIWALA, A., PIERCE, S., SATOH, Y., BHAGWAT, S. S., MANNING, A. M. & ANDERSON, D. W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13681-6.
- BI, Y., LIU, G. & YANG, R. 2009. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol*, 218, 467-72.
- BREVING, K. & ESQUELA-KERSCHER, A. 2009. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol*.
- BSHESH, K., ZHAO, B., SPIGHT, D., BIAGGIONI, I., FEOKISTOV, I., DENENBERG, A., WONG, H. R. & SHANLEY, T. P. 2002. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol*, 72, 1027-36.
- CAIVANO, M. & COHEN, P. 2000. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol*, 164, 3018-25.
- CHAMPELOVIER, P., EL ATIFI-BOREL, M., ISSARTEL, J. P., BOUTONNAT, J., BERGER, F. & SEIGNEURIN, D. 2010. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase by SP600125: a cDNA microarray analysis. *Cancer Genomics Proteomics*, 7, 87-92.
- CHEN, Y., TAKESHITA, A., OZAKI, K., KITANO, S. & HANAZAWA, S. 1996. Transcriptional regulation by transforming growth factor beta of the expression of retinoic acid and retinoid X receptor genes in osteoblastic cells is mediated through AP-1. *J Biol Chem*, 271, 31602-6.
- CHENG, H. Y., PAPP, J. W., VARLAMOVA, O., DZIEMA, H., RUSSELL, B., CURFMAN, J. P., NAKAZAWA, T., SHIMIZU, K., OKAMURA, H., IMPEY, S. & OBRIETAN, K. 2007. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, 54, 813-29.

- CHUNG, S., YAO, H., CAITO, S., HWANG, J. W., ARUNACHALAM, G. & RAHMAN, I. 2010a. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*, 501, 79-90.
- CHUNG, S., YAO, H., CAITO, S., HWANG, J. W., ARUNACHALAM, G. & RAHMAN, I. 2010b. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*.
- CHUNG, S. W., CHEN, Y. H. & PERRELLA, M. A. 2005. Role of Ets-2 in the regulation of heme oxygenase-1 by endotoxin. *J Biol Chem*, 280, 4578-84.
- CONACO, C., OTTO, S., HAN, J. J. & MANDEL, G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2422-7.
- CORCORAN, D. L., PANDIT, K. V., GORDON, B., BHATTACHARJEE, A., KAMINSKI, N. & BENOS, P. V. 2009. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One*, 4, e5279.
- CULLEN, B. R. 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 16, 861-5.
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. & COHEN, P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351, 95-105.
- DIGNAM, J. D., LEOVITZ, R. M. & ROEDER, R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11, 1475-89.
- DING, X. C., WEILER, J. & GROSSHANS, H. 2009. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol*, 27, 27-36.
- DOYLE, S. L. & O'NEILL, L. A. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*, 72, 1102-13.
- DRESKIN, S. C., THOMAS, G. W., DALE, S. N. & HEASLEY, L. E. 2001. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J Immunol*, 166, 5646-53.
- DROBIC, B., PEREZ-CADAHIA, B., YU, J., KUNG, S. K. & DAVIE, J. R. 2010. Promoter chromatin remodeling of immediate-early genes is mediated through H3 phosphorylation at either serine 28 or 10 by the MSK1 multi-protein complex. *Nucleic Acids Res*, 38, 3196-208.
- DU, R., LONG, J., YAO, J., DONG, Y., YANG, X., TANG, S., ZUO, S., HE, Y. & CHEN, X. 2010. Subcellular quantitative proteomics reveals multiple pathway cross-talk that coordinates specific signaling and transcriptional regulation for the early host response to LPS. *J Proteome Res*, 9, 1805-21.
- DUNN, K. L., ESPINO, P. S., DROBIC, B., HE, S. & DAVIE, J. R. 2005. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol*, 83, 1-14.
- ELTON, T. S., KUHN, D. E., MALANA, G. E., MARTIN, M. M., NUOVO, G. J., PLEISTER, A. P. & FELDMAN, D. S. MiR-132 Regulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression Through a Protein Coding Region Binding Site. 2010. *Circulation*, 118:S_513
- ESPELIN, C. W., GOLDSIPE, A., SORGER, P. K., LAUFFENBURGER, D. A., DE GRAAF, D. & HENDRIKS, B. S. 2010. Elevated GM-CSF and IL-1beta levels compromise the ability of p38 MAPK inhibitors to modulate TNFalpha levels in the human monocytic/macrophage U937 cell line. *Mol Biosyst*, 6, 1956-72.
- FABIAN, M. R., SONENBERG, N. & FILIPOWICZ, W. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351-79.

- FAZI, F. & NERVI, C. 2008. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res*, 79, 553-61.
- FIEDLER, S. D., CARLETTI, M. Z., HONG, X. & CHRISTENSON, L. K. 2008. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 79, 1030-7.
- FUJITA, S., ITO, T., MIZUTANI, T., MINOGUCHI, S., YAMAMICHI, N., SAKURAI, K. & IBA, H. 2008. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*, 378, 492-504.
- GALAS, D. J. & SCHMITZ, A. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 5, 3157-70.
- GAO, Z. & YE, J. 2008. Inhibition of transcriptional activity of c-JUN by SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 793-6.
- GARCIA-SANCHEZ, R., AYALA-LUJAN, J., HERNANDEZ-PEREZ, A., MENDOZA-FIGUEROA, T. & TAPIA-RAMIREZ, J. 2003. Identification of repressor element 1 in cytochrome P450 genes and their negative regulation by RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor. *Biochim Biophys Acta*, 1620, 39-46.
- GHISLETTI, S., BAROZZI, I., MIETTON, F., POLLETTI, S., DE SANTA, F., VENTURINI, E., GREGORY, L., LONIE, L., CHEW, A., WEI, C. L., RAGOISSIS, J. & NATOLI, G. 2010. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. *Immunity*, 32, 317-28.
- GROUPP, E. R. & DONOVAN-PELUSO, M. 1996. Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activates binding of c-Jun, Ets, and Egr-1 to the tissue factor promoter. *J Biol Chem*, 271, 12423-30.
- GUHA, M. & MACKMAN, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13, 85-94.
- GUHA, M., O'CONNELL, M. A., PAWLINSKI, R., HOLLIS, A., MCGOVERN, P., YAN, S. F., STERN, D. & MACKMAN, N. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98, 1429-39.
- GUO, Y., ZHAO, G., TANAKA, S. & YAMAGUCHI, T. 2009. Differential responses between monocytes and monocyte-derived macrophages for lipopolysaccharide stimulation of calves. *Cell Mol Immunol*, 6, 223-9.
- HATAKEYAMA, H., CHENG, H., WIRTH, P., COUNSELL, A., MARCROM, S. R., WOOD, C. B., POHLMANN, P. R., GILBERT, J., MURPHY, B., YARBROUGH, W. G., WHEELER, D. L., HARARI, P. M., GUO, Y., SHYR, Y., SLEBOS, R. J. & CHUNG, C. H. 2010. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 5, e12702.
- HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D. & LOENING, S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 25, 3957-8.
- HOLLANDER, J. A., IM, H. I., AMELIO, A. L., KOCERHA, J., BALI, P., LU, Q., WILLOUGHBY, D., WAHLESTEDT, C., CONKRIGHT, M. D. & KENNY, P. J. 2010. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, 466, 197-202.
- HUANG, V., QIN, Y., WANG, J., WANG, X., PLACE, R. F., LIN, G., LUE, T. F. & LI, L. C. 2010. RNAa is conserved in mammalian cells. *PLoS One*, 5, e8848.
- INCORONATO, M., GAROFALO, M., URSO, L., ROMANO, G., QUINTAVALLE, C., ZANCA, C., IABONI, M., NUOVO, G., CROCE, C. M. & CONDORELLI, G. 2010.

- miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED. *Cancer Res*, 70, 3638-46.
- IRARRAZABAL, C. E., WILLIAMS, C. K., ELY, M. A., BIRRER, M. J., GARCIA-PEREZ, A., BURG, M. B. & FERRARIS, J. D. 2008. Activator protein-1 contributes to high NaCl-induced increase in tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein transactivating activity. *J Biol Chem*, 283, 2554-63.
- JIANG, G., DALLAS-YANG, Q., LIU, F., MOLLER, D. E. & ZHANG, B. B. 2003. Salicylic acid reverses phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)- and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine 307 phosphorylation and insulin resistance in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. *J Biol Chem*, 278, 180-6.
- KAGEYAMA, R., MERLINO, G. T. & PASTAN, I. 1989. Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box. *J Biol Chem*, 264, 15508-14.
- KAI, Z. S. & PASQUINELLI, A. E. 2010. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 5-10.
- KIM, V. N., HAN, J. & SIOMI, M. C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-39.
- KLEIN, M. E., LIOY, D. T., MA, L., IMPEY, S., MANDEL, G. & GOODMAN, R. H. 2007. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci*, 10, 1513-4.
- KOHRO, T., TANAKA, T., MURAKAMI, T., WADA, Y., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T. & KODAMA, T. 2004. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*, 11, 88-97.
- KONISHI, H., SUGIYAMA, M., MIZUNO, K., SAITO, H., YATABE, Y., TAKAHASHI, T. & OSADA, H. 2003. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene*, 22, 1892-905.
- KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
- LAGOS, D., POLLARA, G., HENDERSON, S., GRATRIZ, F., FABANI, M., MILNE, R. S., GOTCH, F. & BOSHOF, C. 2010. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*, 12, 513-9.
- LANIEL, M. A., BELIVEAU, A. & GUERIN, S. L. 2001. Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 148, 13-30.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-60.
- LIETZ, M., HOHL, M. & THIEL, G. 2003. RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Eur J Biochem*, 270, 2-9.
- LIEW, F. Y., XU, D., BRINT, E. K. & O'NEILL, L. A. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 5, 446-58.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LU, Y. C., YEH, W. C. & OHASHI, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-51.

- MA, W., GEE, K., LIM, W., CHAMBERS, K., ANGEL, J. B., KOZLOWSKI, M. & KUMAR, A. 2004. Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol*, 172, 318-30.
- MAGILL, S. T., CAMBRONNE, X. A., LUIKART, B. W., LIOY, D. T., LEIGHTON, B. H., WESTBROOK, G. L., MANDEL, G. & GOODMAN, R. H. 2010. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20382-7.
- MARSON, A., LEVINE, S. S., COLE, M. F., FRAMPTON, G. M., BRAMBRINK, T., JOHNSTONE, S., GUENTHER, M. G., JOHNSTON, W. K., WERNIG, M., NEWMAN, J., CALABRESE, J. M., DENNIS, L. M., VOLKERT, T. L., GUPTA, S., LOVE, J., HANNETT, N., SHARP, P. A., BARTEL, D. P., JAENISCH, R. & YOUNG, R. A. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 521-33.
- MATT, T. 2002. Transcriptional control of the inflammatory response: a role for the CREB-binding protein (CBP). *Acta Med Austriaca*, 29, 77-9.
- MONTEYS, A. M., SPENGLER, R. M., WAN, J., TECEDOR, L., LENNOX, K. A., XING, Y. & DAVIDSON, B. L. 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16, 495-505.
- MURATA, K., YOSHITOMI, H., TANIDA, S., ISHIKAWA, M., NISHITANI, K., ITO, H. & NAKAMURA, T. 2010. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R86.
- NAHID, M. A., PAULEY, K. M., SATOH, M. & CHAN, E. K. 2009. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*, 284, 34590-9.
- NAKAYAMA, T., HIESHIMA, K., ARAO, T., JIN, Z., NAGAKUBO, D., SHIRAKAWA, A. K., YAMADA, Y., FUJII, M., OISO, N., KAWADA, A., NISHIO, K. & YOSHIE, O. 2008. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene*, 27, 3221-32.
- NEMOTO, S., FERGUSON, M. M. & FINKEL, T. 2004. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, 306, 2105-8.
- NUDELMAN, A. S., DIROCCO, D. P., LAMBERT, T. J., GARELICK, M. G., LE, J., NATHANSON, N. M. & STORM, D. R. 2010. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus*, 20, 492-8.
- O'CONNELL, R. M., RAO, D. S., CHAUDHURI, A. A. & BALTIMORE, D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 111-22.
- O'NEILL, L. A. 2009. Boosting the brain's ability to block inflammation via microRNA-132. *Immunity*, 31, 854-5.
- OGAWA, E., SAITO, Y., KUWAHARA, K., HARADA, M., MIYAMOTO, Y., HAMANAKA, I., KAJIYAMA, N., TAKAHASHI, N., IZUMI, T., KAWAKAMI, R., KISHIMOTO, I., NARUSE, Y., MORI, N. & NAKAO, K. 2002. Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element-dependent repression. *Cardiovasc Res*, 53, 451-9.
- OLENA, A. F. & PATTON, J. G. 2010. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, 222, 540-5.

- OLIVE, M., KRYLOV, D., ECHLIN, D. R., GARDNER, K., TAPAROWSKY, E. & VINSON, C. 1997. A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem*, 272, 18586-94.
- OSOEGAWA, K., MAMMOSER, A. G., WU, C., FRENGEN, E., ZENG, C., CATANESE, J. J. & DE JONG, P. J. 2001. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*, 11, 483-96.
- OZSOLAK, F., POLING, L. L., WANG, Z., LIU, H., LIU, X. S., ROEDER, R. G., ZHANG, X., SONG, J. S. & FISHER, D. E. 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 22, 3172-83.
- PAULEY, K. M., SATOH, M., CHAN, A. L., BUBB, M. R., REEVES, W. H. & CHAN, E. K. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 10, R101.
- PAULEY, K. M., SATOH, M., PAULEY, B. A., DOMINGUEZ-GUTIERREZ, P. R., WALLET, S. M., HOLLIDAY, L. S., CHA, S., REEVES, W. H. & CHAN, E. K. 2010. Formation of GW/P bodies as marker for microRNA-mediated regulation of innate immune signaling in THP-1 cells. *Immunol Cell Biol*, 88, 205-12.
- PINNOJI, R. C., BEDADALA, G. R., GEORGE, B., HOLLAND, T. C., HILL, J. M. & HSIA, S. C. 2007. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification. *Virol J*, 4, 56.
- PLACE, R. F., LI, L. C., POOKOT, D., NOONAN, E. J. & DAHIYA, R. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1608-13.
- PLAISANCE, V., NIEDERHAUSER, G., AZZOUZ, F., LENAIN, V., HAEFLIGER, J. A., WAEBER, G. & ABDERRAHMANI, A. 2005. The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J Biol Chem*, 280, 401-7.
- RAMACHANDRAN, K., GOPSETTY, G., GORDIAN, E., NAVARRO, L., HADER, C., REIS, I. M., SCHULZ, W. A. & SINGAL, R. 2009. Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res*, 69, 1527-35.
- REMENYI, J., HUNTER, C. J., COLE, C., ANDO, H., IMPEY, S., MONK, C. E., MARTIN, K. J., BARTON, G. J., HUTVAGNER, G. & ARTHUR, J. S. 2010. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK and CREB in response to neurotrophins. *Biochem J*.
- RUGGIERO, T., TRABUCCHI, M., DE SANTA, F., ZUPO, S., HARFE, B. D., MCMANUS, M. T., ROSENFELD, M. G., BRIATA, P. & GHERZI, R. 2009. LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. *FASEB J*, 23, 2898-908.
- RUI, W., BING, F., HAI-ZHU, S., WEI, D. & LONG-BANG, C. 2010. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). *J Cell Mol Med*, 14, 206-14.
- SAHDEV, S., SAINI, S., TIWARI, P., SAXENA, S. & SINGH SAINI, K. 2007. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes*, 21, 303-7.
- SAINI, H. K., GRIFFITHS-JONES, S. & ENRIGHT, A. J. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17719-24.
- SCHANEN, B. C. & LI, X. 2010. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics*.

- SHAKED, I., MEERSON, A., WOLF, Y., AVNI, R., GREENBERG, D., GILBOA-GEFFEN, A. & SOREQ, H. 2009. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*, 31, 965-73.
- SHANG, L., ZHOU, H., XIA, Y., WANG, H., GAO, G., CHEN, B., LIU, Q., SHAO, C. & GONG, Y. 2009. Serum withdrawal up-regulates human SIRT1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Cell Mol Med*, 13, 4176-84.
- SHEEDY, F. J. & O'NEILL, L. A. 2008. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*, 67 Suppl 3, iii50-5.
- SHEN, Z., AJMO, J. M., ROGERS, C. Q., LIANG, X., LE, L., MURR, M. M., PENG, Y. & YOU, M. 2009. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1047-53.
- SKOOG, T., HAMSTEN, A. & ERIKSSON, P. 2006. Allele-specific chromatin remodeling of the tumor necrosis factor-alpha promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 777-83.
- SOLOAGA, A., THOMSON, S., WIGGIN, G. R., RAMPERSAUD, N., DYSON, M. H., HAZZALIN, C. A., MAHADEVAN, L. C. & ARTHUR, J. S. 2003. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J*, 22, 2788-97.
- STASSI, G., GAROFALO, M., ZERILLI, M., RICCI-VITIANI, L., ZANCA, C., TODARO, M., ARAGONA, F., LIMITE, G., PETRELLA, G. & CONDORELLI, G. 2005. PED mediates AKT-dependent chemoresistance in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 65, 6668-75.
- STRUM, J. C., JOHNSON, J. H., WARD, J., XIE, H., FEILD, J., HESTER, A., ALFORD, A. & WATERS, K. M. 2009. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol*, 23, 1876-84.
- SWEET, M. J. & HUME, D. A. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol*, 60, 8-26.
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12481-6.
- TANG, Y., BANAN, A., FORSYTH, C. B., FIELDS, J. Z., LAU, C. K., ZHANG, L. J. & KESHAVARZIAN, A. 2008. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 355-64.
- THOMSON, J. M., NEWMAN, M., PARKER, J. S., MORIN-KENSICKI, E. M., WRIGHT, T. & HAMMOND, S. M. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*, 20, 2202-7.
- TSAI, E. Y., FALVO, J. V., TSYTSYKOVA, A. V., BARCZAK, A. K., REIMOLD, A. M., GLIMCHER, L. H., FENTON, M. J., GORDON, D. C., DUNN, I. F. & GOLDFELD, A. E. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol*, 20, 6084-94.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T. & TADA, K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26, 171-6.
- TUDHOPE, S. J., FINNEY-HAYWARD, T. K., NICHOLSON, A. G., MAYER, R. J., BARNETTE, M. S., BARNES, P. J. & DONNELLY, L. E. 2008. Different mitogen-activated protein kinase-dependent cytokine responses in cells of the monocyte lineage. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 306-12.

- TURNER, M. J. & SLACK, F. J. 2009. Transcriptional control of microRNA expression in *C. elegans*: promoting better understanding. *RNA Biol*, 6, 49-53.
- UCAR, A., VAFAIZADEH, V., JARRY, H., FIEDLER, J., KLEMMT, P. A., THUM, T., GRONER, B. & CHOWDHURY, K. 2010. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nat Genet*, 42, 1101-8.
- VAISHNAV, D., JAMBAL, P., REUSCH, J. E. & PUGAZHENTHI, S. 2003. SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, 855-60.
- VASUDEVAN, S., TONG, Y. & STEITZ, J. A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931-4.
- VERDEL, A., VAVASSEUR, A., LE GORREC, M. & TOUAT-TODESCHINI, L. 2009. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol*, 53, 245-57.
- VERMEULEN, L., BERGHE, W. V., BECK, I. M., DE BOSSCHER, K. & HAEGEMAN, G. 2009. The versatile role of MSKs in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 34, 311-8.
- VERMEULEN, L., DE WILDE, G., VAN DAMME, P., VANDEN BERGHE, W. & HAEGEMAN, G. 2003. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J*, 22, 1313-24.
- VO, N. & GOODMAN, R. H. 2001. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 276, 13505-8.
- VO, N., KLEIN, M. E., VARLAMOVA, O., KELLER, D. M., YAMAMOTO, T., GOODMAN, R. H. & IMPEY, S. 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16426-31.
- WADA, R., AKIYAMA, Y., HASHIMOTO, Y., FUKAMACHI, H. & YUASA, Y. 2009. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer*.
- WANG, G., WANG, Y., TENG, M., ZHANG, D., LI, L. & LIU, Y. 2010. Signal transducers and activators of transcription-1 (STAT1) regulates microRNA transcription in interferon gamma-stimulated HeLa cells. *PLoS One*, 5, e11794.
- WANG, X., XUAN, Z., ZHAO, X., LI, Y. & ZHANG, M. Q. 2009. High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost_HM. *Genome Res*, 19, 266-75.
- WAYMAN, G. A., DAVARE, M., ANDO, H., FORTIN, D., VARLAMOVA, O., CHENG, H. Y., MARKS, D., OBRIETAN, K., SODERLING, T. R., GOODMAN, R. H. & IMPEY, S. 2008. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9093-8.
- WESTBROOK, T. F., HU, G., ANG, X. L., MULLIGAN, P., PAVLOVA, N. N., LIANG, A., LENG, Y., MAEHR, R., SHI, Y., HARPER, J. W. & ELLEDGE, S. J. 2008. SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature*, 452, 370-4.
- WIBRAND, K., PANJA, D., TIRON, A., OFTE, M. L., SKAFTNESMO, K. O., LEE, C. S., PENA, J. T., TUSCHL, T. & BRAMHAM, C. R. 2010. Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci*, 31, 636-45.
- WONG, T. S., LIU, X. B., WONG, B. Y., NG, R. W., YUEN, A. P. & WEI, W. I. 2008. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 14, 2588-92.

- WU, J. & XIE, X. 2006. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol*, 7, R85.
- YEUNG, F., HOBERG, J. E., RAMSEY, C. S., KELLER, M. D., JONES, D. R., FRYE, R. A. & MAYO, M. W. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 23, 2369-80.
- YI, R., DOEHLE, B. P., QIN, Y., MACARA, I. G. & CULLEN, B. R. 2005. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA*, 11, 220-6.
- YUEN, T., RUF, F., CHU, T. & SEALFON, S. C. 2009. Microtranscriptome regulation by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol*, 302, 12-7.
- YUSTEIN, A. S., HARPER, J. C., PETRONI, G. R., CUMMINGS, O. W., MOSKALUK, C. A. & POWELL, S. M. 1999. Allelotype of gastric adenocarcinoma. *Cancer Res*, 59, 1437-41.
- ZHAO, S. & LIU, M. F. 2009. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Sci China C Life Sci*, 52, 1111-6.
- ZHOU, X., RUAN, J., WANG, G. & ZHANG, W. 2007. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol*, 3, e37.

Annexes

Annexe 1 : Analyse des sites putatifs de liaison de facteurs de transcription dans la séquence génomique humaine comprise entre les 5000 pb en amont du pre-miR-212 et l'extrémité avale pre-miR-132 (longueur totale : 5473 pb).

La séquence analysée provient du contig « NT_010718.16 | 1556576-1562048 Homo Sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly » (disponible sur le site web du NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Elle a été analysée à l'aide du logiciel Transfac (Biobase) avec la matrice « vertébrés non redondant minimisant les faux positifs » (a) et la matrice « cellules immunes minimisant les faux positifs » (b).

Les sites identifiés au sein de la région promotrice putative clonée au cours de cette étude sont indiqués en gras.

(a) Matrice « vertébrés non redondant minimisant les faux positifs » (279 sites putatifs identifiés):

matrix identifier	position (strand)	core score	matrix score	sequence (always the (+)-strand is shown)	factor name
V\$VDR_Q3	97 (-)	0.956	0.929	tgtcccggtCCCC	VDR
V\$KID3_Q1	139 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$P53_Q2	148 (-)	1.000	0.988	ggGCATGtcg	p53
V\$AP2ALPHA_Q1	161 (+)	1.000	0.999	GCCCCgggc	AP-2alpha
V\$AP2ALPHA_Q1	161 (-)	1.000	1.000	gcccCGGGC	AP-2alpha
V\$KID3_Q1	196 (-)	1.000	1.000	CGTGG	Kid3
V\$LRF_Q2	221 (+)	1.000	0.995	cgggCCCCC	LRF
V\$ETF_Q6	283 (-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$AP2_Q6	322 (-)	1.000	0.975	ggccgCGGGGcg	AP-2
V\$KID3_Q1	351 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$ZF5_B	357 (+)	1.000	0.941	cgcgggCGCGCag	ZF5
V\$ZF5_B	414 (+)	0.919	0.859	tggaggCGCACag	ZF5
V\$TAL1BETA47_Q1	419 (+)	1.000	0.938	gcgcaCAGATgctgag	Tal-1beta:E47
V\$AP2_Q6_Q1	433 (-)	0.986	0.982	agCCCCGggggag	AP-2
V\$MAZ_Q6	440 (+)	1.000	1.000	gGGAGGgg	MAZ
V\$CKROX_Q2	440 (-)	1.000	1.000	gggGAGGGg	CKROX
V\$PAX4_Q3	445 (+)	1.000	0.976	ggggccCACCCt	Pax-4
V\$KID3_Q1	450 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$KID3_Q1	475 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$KID3_Q1	485 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$AHRArnt_Q1	505 (-)	1.000	0.965	ggaCACGcgagtccca	AhR:Arnt
V\$STAT_Q6	516 (-)	1.000	0.993	tccCAGAAacct	STAT
V\$SZF1_Q1	516 (-)	1.000	0.847	tcccagaaaCCCTGg	SZF1-1
V\$ZF5_B	540 (-)	0.919	0.887	ctGAGCGctccca	ZF5
V\$PAX4_Q3	614 (-)	1.000	0.979	cGGGTGgtgggg	Pax-4
V\$VDR_Q3	615 (+)	1.000	0.925	GGGTGgtgggggaga	VDR
V\$KID3_Q1	616 (-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$KID3_Q1	619 (-)	1.000	1.000	GTGGG	Kid3
V\$PAX6_Q2	656 (+)	1.000	0.837	ctctccTGAActc	Pax-6
V\$P300_Q1	661 (-)	1.000	0.978	ctggaACTCCcctg	p300
V\$TAX_Q2	702 (+)	0.800	0.778	tGGACGcactcccca	Tax/
V\$P300_Q1	704 (-)	1.000	0.991	gacgcACTCCccaa	p300
V\$SPZ1_Q1	716 (-)	0.989	0.966	aacacacCCACCctc	Spz1
V\$PAX4_Q3	718 (+)	1.000	0.988	caacacCACCCt	Pax-4
V\$MINI19_B	721 (+)	0.998	0.917	accacccctCACTCagcgca	Muscle initiator sequences-19
V\$KID3_Q1	723 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$GEN_INI3_B	727 (+)	0.989	0.990	cctCACTC	GEN_INI
V\$CP2_Q2	777 (-)	0.941	0.954	ccagccctatCCAGG	CP2/LBP-1c/LSF
V\$GABP_B	833 (-)	1.000	0.920	gcccCTTCCcg	GABP
V\$KID3_Q1	877 (+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$PPARA_Q1	893 (+)	0.899	0.753	gggaacctgggCAGAGgtgt	PPARalpha:RXRalpha
V\$PPAR_DR1_Q2	900 (-)	0.851	0.859	tgggcagAGGTGt	PPAR direct repeat 1
V\$TBX5_Q1	905 (+)	1.000	0.993	agaGGTGTtacc	TBX5
V\$ZF5_B	921 (-)	0.888	0.856	caGCCCGccctga	ZF5
V\$KID3_Q1	957 (+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$CP2_Q2	978 (+)	0.968	0.888	ACTGGAagtggctgg	CP2/LBP-1c/LSF
V\$GABP_B	978 (+)	1.000	0.923	actGGAAGtgcc	GABP
V\$TEL2_Q6	979 (-)	1.000	0.890	ctgGAAGTgg	Tel-2
V\$AP2_Q6	997 (-)	0.952	0.938	cgccCTCGGGgg	AP-2
V\$VMyb_Q2	1050 (-)	1.000	0.935	gCGTTTtg	v-Myb
V\$KID3_Q1	1069 (-)	1.000	1.000	CGTGG	Kid3
V\$SPZ1_Q1	1081 (-)	0.989	0.975	ctccaaCCACCcg	Spz1
V\$PAX4_Q3	1083 (+)	1.000	0.983	ccaaccCACCCg	Pax-4
V\$KID3_Q1	1088 (+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$AP2_Q6_Q1	1115 (-)	1.000	0.984	gGCTGcggtgg	AP-2
V\$DEC_Q1	1147 (+)	1.000	1.000	cccCACGTgaagg	DEC
V\$KID3_Q1	1149 (+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$TAX_Q2	1169 (+)	1.000	0.892	tgtgggTGACGtctc	Tax/
V\$KID3_Q1	1171 (+)	1.000	0.997	tgggTGACGtctc	Kid3
V\$KID3_Q4_Q1	1172 (+)	1.000	0.973	gggTGACGtctc	Kid3
V\$STAT_Q6	1179 (+)	1.000	0.999	gtctcTTCGgga	STAT
V\$PAX5_Q2	1204 (-)	0.819	0.747	cgcaactgtcgCGCCGctgcagctac	Pax-5
V\$CETS1P54_Q3	1232 (+)	1.000	0.979	tactcCGGAAGtgcc	c-Ets-1 p54
V\$CETS1P54_Q2	1233 (+)	1.000	0.985	actcCGGAAGtg	c-Ets-1 (p54)

Annexes

V\$GABP_B	1235	(+)	1.000	0.955	tccGGAAgtggc	GABP
V\$TEL2_Q6	1236	(-)	1.000	0.906	cgcGAAgtgg	Tel-2
V\$PAX5_Q2	1254	(-)	0.839	0.746	agccccgcgcGCACcaagcctcctgcg	Pax-5
V\$ETF_Q6	1258	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$KID3_Q1	1301	(+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$DR3_Q4	1318	(+)	1.000	0.868	cccgcacctccTGACccccgc	VDR, CAR, PXR
V\$SP1_Q2_01	1333	(+)	1.000	0.979	ccCGCCcacc	SP1
V\$KID3_Q1	1349	(-)	1.000	1.000	CGTGG	Kid3
V\$WT1_Q6	1355	(-)	0.998	0.999	gcgGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1357	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1358	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1359	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1360	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1361	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$WT1_Q6	1362	(-)	0.998	0.999	gggGGGGGg	WT1
V\$ETF_Q6	1383	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$KID3_Q1	1412	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$TAX_02	1434	(-)	0.800	0.802	ggggcgctgCGTTAc	Tax/
V\$RFX1_Q2	1442	(+)	1.000	0.986	gcgttaccatgGCAACcg	RFX1
V\$RFX1_Q2	1442	(-)	0.992	0.987	gcGTTACcatggcaaccg	RFX1
V\$ZF5_B	1462	(+)	0.919	0.865	gaggtgCGCCcag	ZF5
V\$ZF5_B	1505	(+)	1.000	0.862	agcaacCGCGctc	ZF5
V\$DR1_Q3	1532	(-)	0.909	0.908	tgteCTCTGgccc	PPAR, HNF-4, COUP, RAR
V\$PPAR_DR1_Q2	1532	(+)	0.876	0.910	tGTCTCTgtgccc	PPAR direct repeat 1
V\$PAX5_Q2	1544	(-)	0.819	0.805	cccatggcccCGCCAagaggtaccggctg	Pax-5
V\$AP1_Q2_01	1565	(-)	1.000	0.992	ccggtgAGTCA	AP-1
V\$MAF_Q6_01	1567	(+)	1.000	0.983	gcgtgAGTCAc	MAF
V\$LRF_Q2	1607	(+)	1.000	0.989	gcggCCCCC	LRF
V\$ZF5_B	1632	(-)	0.919	0.854	tcGGGCGcccccc	ZF5
V\$LRF_Q2	1635	(+)	1.000	0.992	ggcgCCCCC	LRF
V\$AP2_Q6	1637	(+)	0.992	0.944	cgCCCCCgggag	AP-2
V\$ETF_Q6	1726	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$P300_Q1	1766	(-)	1.000	0.980	tacccACTCCctct	p300
V\$GEN_INI3_B	1800	(+)	0.986	0.987	cctCACTT	GEN_INI
V\$VMyb_Q2	1832	(+)	1.000	0.931	gaaAACGGa	v-Myb
V\$EBF_Q6	1859	(-)	1.000	0.969	ttcttAGGGAa	EBF
V\$AP2_Q6	1887	(-)	0.953	0.941	cgcccGAGGGac	AP-2
V\$ZF5_B	1892	(+)	0.922	0.886	gaggggaCGTGctg	ZF5
V\$HIF1_Q3	1893	(+)	1.000	0.957	agggACGTGctg	HIF1
V\$PAX6_Q2	1909	(+)	1.000	0.842	ctgaggtGGAAGtt	Pax-6
V\$KID3_Q1	1913	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$KID3_Q1	1940	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$HANDIE47_01	2084	(-)	1.000	0.944	aaatCCAGActatgca	Hand1:E47
V\$DR3_Q4	2098	(+)	1.000	0.839	cagggcctctcTGACCCcacc	VDR, CAR, PXR
V\$VDR_Q3	2100	(-)	1.000	0.910	ggggcctctcTGACCC	VDR
V\$PAX4_Q3	2151	(+)	1.000	0.991	atccccCACCCc	Pax-4
V\$SP3_Q3	2154	(-)	0.925	0.897	CCCCACccccgact	Sp3
V\$CACD_Q1	2156	(+)	0.960	0.973	ccaCCCCC	CACD
V\$KID3_Q1	2156	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$PAX5_Q2	2251	(+)	0.919	0.744	agtctttattcttCAGCGttccccacac	Pax-5
V\$CETS1P54_Q3	2272	(-)	0.988	0.962	ccccacATCCGctccc	c-Ets-1 p54
V\$FXR_Q3	2288	(+)	0.767	0.827	caagtttaacTTACT	FXR/RXR-alpha
V\$GEN_INI3_B	2324	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2394	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2464	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2534	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2604	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2674	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2744	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2814	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2884	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$GEN_INI3_B	2954	(+)	0.988	0.989	cctCATTG	GEN_INI
V\$PAX4_Q3	3004	(-)	1.000	0.959	aGGGTGaggacc	Pax-4
V\$CETS1P54_Q3	3063	(-)	1.000	0.956	ccgctcTTCGGcccat	c-Ets-1 p54
V\$GABP_B	3064	(-)	1.000	0.986	cgctCTTCCggc	GABP
V\$CKROX_Q2	3089	(+)	1.000	1.000	gCCCTCccc	CKROX
V\$MAZ_Q6	3090	(-)	1.000	1.000	ccCTCCCc	MAZ
V\$CP2_Q2	3154	(-)	0.941	0.916	ctcgatggagCCAGG	CP2/LBP-1c/LSF
V\$SZF1_Q1	3202	(+)	1.000	0.846	cCAGGGgaactgccc	SZF1-1
V\$MYB_Q3	3208	(-)	1.000	0.996	gAACTGcccca	MYB
V\$SZF1_Q1	3283	(-)	1.000	0.887	ctctctcctcCCCTGg	SZF1-1
V\$LRF_Q2	3296	(-)	1.000	1.000	GGGGGcccc	LRF
V\$PAX8_Q1	3327	(-)	0.973	0.936	ctTCACTctctatta	Pax-8
V\$PAX3_B	3340	(-)	1.000	0.825	taccctaaCGTGAgtctg	Pax-3
V\$XVENT1_Q1	3374	(-)	1.000	0.920	ccaCAAAATggtcc	Xvent-1
V\$KID3_Q1	3390	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$PAX5_Q2	3402	(+)	0.973	0.766	atgccaggtctgGAGCGtgccactgac	Pax-5
V\$PAX3_B	3410	(-)	0.815	0.823	ctctggagCGTGGcactgaca	Pax-3
V\$KID3_Q1	3418	(-)	1.000	1.000	CGTGG	Kid3
V\$PAX4_Q3	3464	(+)	1.000	0.964	tcctctCACCCc	Pax-4
V\$TAX_02	3481	(+)	0.800	0.758	ctGGCGggttcccc	Tax/
V\$ZF5_B	3482	(-)	1.000	0.854	tgGCGCGttcccc	ZF5
V\$RFX1_Q2	3486	(-)	0.982	0.928	gcGTTCCcccagctccct	RFX1
V\$VMyb_Q2	3514	(-)	1.000	0.966	cCGGTGgt	v-Myb
V\$PPARG_Q2	3538	(+)	0.627	0.682	ggttgGCCCAccttccccaaactt	PPARgamma:RXRalpha, PPARgamma
V\$VDR_Q3	3541	(-)	0.953	0.933	tgggccacactTCCCC	VDR
V\$KID3_Q1	3545	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$CP2_Q2	3587	(+)	0.941	0.937	CCTGGgtggtacactg	CP2/LBP-1c/LSF
V\$KID3_Q1	3591	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$LRF_Q2	3720	(+)	1.000	0.989	caggCCCCC	LRF
V\$KID3_Q1	3727	(+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$PAX4_Q3	3749	(+)	1.000	0.976	cctgccCACCCct	Pax-4
V\$KID3_Q1	3754	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$PAX4_Q3	3771	(-)	1.000	0.964	agGGTGcgcgaca	Pax-4
V\$KID3_Q1	3773	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$RFX1_Q2	3801	(+)	0.982	0.934	gtgtgacggcaGAAACgt	RFX1
V\$GEN_INI3_B	3829	(-)	0.993	0.994	AACTGagg	GEN_INI
V\$KID3_Q1	3852	(-)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$PAX3_B	3887	(-)	1.000	0.854	aaggagagCGTGAataagctc	Pax-3
V\$ETF_Q6	3915	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$AP2_Q6_01	3941	(+)	1.000	0.996	ccggccccCAGGCC	AP-2
V\$STAT1_Q1	3953	(+)	0.817	0.845	ccgcggttcCGGAAagttaac	STAT1
V\$STAT1_Q1	3953	(-)	0.954	0.878	ccgcggtTCCGGaaagttaac	STAT1

Annexes

V\$ETF_Q6	4011	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$ETF_Q6	4014	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$KROX_Q6	4024	(+)	1.000	0.959	cgcgCCCCtctctc	KROX
V\$PAX4_Q3	4054	(+)	1.000	0.989	ggtccccCACCCc	Pax-4
V\$SPZ1_Q1	4056	(-)	0.998	0.978	tccccacCCCCGcc	Spz1
V\$SP3_Q3	4058	(-)	0.944	0.897	cCCACccccgcct	Sp3
V\$CADC_Q1	4059	(+)	0.960	0.973	ccaCCCC	CADC
V\$KID3_Q1	4059	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$MEF2_Q3	4070	(+)	1.000	0.967	ctcgccactatAAATAgcccc	MEF-2
V\$RSRFC4_Q2	4074	(+)	1.000	0.949	ccactataAAATAGcccc	RSRFC4
V\$CDXA_Q2	4078	(-)	1.000	1.000	tATAAAt	CdxA
V\$CDXA_Q2	4112	(+)	1.000	0.984	ccgtTGACGtcg	CDXA
V\$CDXA_Q4_Q1	4113	(+)	1.000	0.983	cgcTGACGtcg	CDXA
V\$ATF6_Q1	4116	(+)	1.000	0.917	TGACGtcg	ATF6
V\$ZF5_B	4125	(-)	1.000	0.846	caGCGCGtcagtg	ZF5
V\$ETF_Q6	4165	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$ZF5_B	4181	(-)	1.000	0.846	acGCGCGcctata	ZF5
V\$ETF_Q6	4198	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$PAX5_Q2	4244	(+)	1.000	0.744	cgcccccgccaggtAAGCGggacggacca	Pax-5
V\$PAX3_B	4252	(-)	0.818	0.844	caggttaagCGGACggaccag	Pax-3
V\$SPZ1_Q1	4327	(+)	0.984	0.971	ggcGGCGGgtggggc	Spz1
V\$ETF_Q6	4328	(+)	1.000	1.000	gcGGCGG	ETF
V\$PAX4_Q3	4332	(-)	1.000	0.984	CGGGTGggggcgg	Pax-4
V\$KID3_Q1	4334	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$PAX4_Q3	4351	(-)	1.000	0.999	gGGGTGgggatg	Pax-4
V\$KID3_Q1	4353	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$KROX_Q6	4357	(-)	1.000	0.952	gggatGGGGGcgga	KROX
V\$DR3_Q4	4370	(-)	0.907	0.848	acgggGGGCAccgggtcccc	VDR, CAR, PXR
V\$HIC1_Q2	4371	(-)	1.000	0.987	cgggGGGCAccgggg	HIC1
V\$PPARA_Q2	4372	(+)	0.823	0.841	ggggGGGCAccgggggtcccc	PPARalpha:RXRalpha
V\$LRF_Q2	4373	(-)	1.000	0.989	GGGGGcacc	LRF
V\$VDR_Q3	4374	(+)	0.956	0.915	GGGGCAccgggggtcc	VDR
V\$ZF5_B	4423	(+)	1.000	0.874	cgagccCGCGCag	ZF5
V\$IMO2COM_Q1	4433	(-)	1.000	0.999	cagcACCTGccg	Imo2 complex
V\$AP2_Q6_Q1	4505	(+)	0.986	0.988	cccccccCGGCt	AP-2
V\$WT1_Q6	4505	(+)	0.998	0.999	cCCCCCccc	WT1
V\$AP2_Q6	4506	(+)	0.992	0.932	ccCCCCCcggt	AP-2
V\$GEN_INI3_B	4549	(-)	0.986	0.987	AAGTGagg	GEN_INI
V\$KROX_Q6	4581	(+)	1.000	0.959	cgcgCCCCtctctc	KROX
V\$FXR_Q3	4611	(-)	0.897	0.852	GGTGActcagcctc	FXR/RXR-alpha
V\$MAF_Q6_Q1	4612	(-)	1.000	0.983	gTGACTcagcc	MAF
V\$AP1_Q2_Q1	4613	(+)	1.000	0.991	TGACTcagcctc	AP-1
V\$TAX-Q4_Q2	4663	(+)	0.800	0.769	CGGACGcccccccc	Tax/PAK
V\$PAX4_Q3	4665	(+)	1.000	0.997	gacgccCACCCc	Pax-4
V\$CADC_Q1	4670	(+)	0.960	0.973	ccaCCCC	CADC
V\$KID3_Q1	4670	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$SP1_Q2_Q1	4700	(+)	1.000	0.993	ccCGGCCcgg	SP1
V\$STAT1_Q1	4722	(-)	1.000	0.848	gcccccTCCCGgcaggtccc	STAT1
V\$PAX5_Q2	4733	(+)	0.919	0.773	ggcaggtccccctcCAGCGggtccccg	Pax-5
V\$CP2_Q2	4735	(-)	1.000	0.903	caggtccccctCCAGC	CP2/LBP-1c/LSF
V\$KID3_Q1	4764	(+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$SP1_Q2_Q1	4810	(-)	1.000	1.000	gggGGCGGgg	SP1
V\$SP1_Q2_Q1	4834	(+)	1.000	1.000	ccCGGCCccc	SP1
V\$KROX_Q6	4835	(+)	1.000	0.985	ccccCCCCCaagcc	KROX
V\$CADC_Q1	4842	(+)	0.983	0.988	ccaCGCCC	CADC
V\$KID3_Q1	4842	(+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$CETS1P54_Q3	4849	(+)	1.000	0.983	cccgccCGGAAgtcccc	c-Ets-1 p54
V\$GABP_B	4852	(+)	1.000	0.987	gcccGGAAGtgcc	GABP
V\$TEL2_Q6	4853	(-)	1.000	0.894	ccgGAAAGTgc	Tel-2
V\$LRF_Q2	4858	(+)	1.000	0.989	agtGCCCCC	LRF
V\$CDXA_Q4_Q1	4877	(+)	1.000	0.986	cttTGACGtca	CDXA
V\$PAX3_B	4877	(+)	1.000	0.876	ctttgacgTCACGgcctctg	Pax-3
V\$CDXA_Q4_Q1	4880	(-)	1.000	0.997	tgaCGTCAagg	CDXA
V\$CDXA_Q4_Q1	4893	(+)	1.000	0.994	ctcTGACGtca	CDXA
V\$CDXA_Q4_Q1	4896	(-)	1.000	0.996	tgaCGTCAagg	CDXA
V\$LRF_Q2	4971	(+)	1.000	0.995	agagCCCC	LRF
V\$AP2_Q6	4973	(+)	0.992	0.928	agCCCCAgccg	AP-2
V\$DR3_Q4	4980	(-)	0.907	0.830	agccgGGGCAgccccggcgac	VDR, CAR, PXR
V\$HIC1_Q2	4981	(-)	1.000	0.984	cgcgGGGCAgccccgg	HIC1
V\$HIC1_Q2	4999	(-)	1.000	0.981	accgGGGCAccccgc	HIC1
V\$ZF5_B	5019	(-)	1.000	0.913	caGCGCGccggca	ZF5
V\$PAX3_B	5076	(+)	1.000	0.863	gtctccagTCACGgccaecga	Pax-3
V\$KID3_Q1	5090	(+)	1.000	1.000	CCACC	Kid3
V\$TAX-Q4_Q2	5093	(+)	0.800	0.732	cCGACGcctggcccc	Tax/PAK
V\$PAX5_Q2	5097	(-)	0.873	0.748	cgccctggccccCGCCCcaggaccgggcc	Pax-5
V\$SP1_Q2_Q1	5104	(+)	1.000	0.990	ccCGGCCcca	SP1
V\$ETF_Q6	5129	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$ETF_Q6	5132	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$ETF_Q6	5135	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$SP1_Q2_Q1	5174	(+)	1.000	1.000	ccCGGCCccc	SP1
V\$AP2_Q6_Q1	5175	(+)	0.986	0.984	ccccccccCGGCGc	AP-2
V\$KROX_Q6	5175	(+)	1.000	0.963	cccgCCCCcgcccc	KROX
V\$ETF_Q6	5199	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$NRSF_Q4	5202	(+)	1.000	0.961	cgctgtcgcggtTGCTGa	NRSF
V\$AP2_Q6	5234	(-)	0.942	0.940	gcctaTCGGGcc	AP-2
V\$KID3_Q1	5279	(-)	1.000	1.000	GGTGG	Kid3
V\$ZF5_B	5284	(+)	1.000	0.878	cccaagCGCGCtc	ZF5
V\$KID3_Q1	5285	(+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3
V\$ZF5_B	5287	(-)	1.000	0.883	acGCGCGctcctc	ZF5
V\$ETF_Q6	5305	(-)	1.000	1.000	CCGCCgc	ETF
V\$KROX_Q6	5312	(+)	0.928	0.940	ccccCCCCCcccc	KROX
V\$KROX_Q6	5316	(+)	1.000	0.948	ccccCCCCCcgcg	KROX
V\$WT1_Q6	5320	(+)	0.998	0.999	cCCCCCgcg	WT1
V\$CDXA_Q4_Q1	5331	(+)	1.000	0.996	cccTGACGtca	CDXA
V\$TAX-Q4_Q1	5333	(-)	1.000	0.945	ctgaCGTCAgcccc	Tax/PAK
V\$CDXA_Q4_Q1	5334	(-)	1.000	0.988	tgaCGTCAgccc	CDXA
V\$CDXA_Q2	5334	(-)	1.000	0.990	tgaCGTCAgccc	CDXA
V\$ZF5_B	5340	(-)	0.888	0.866	caGCCCCGccccgc	ZF5
V\$ZF5_B	5364	(-)	1.000	0.856	ccGCGCGccccgc	ZF5
V\$SP1_Q2_Q1	5371	(+)	1.000	1.000	ccCGGCCccc	SP1
V\$SP3_Q3	5371	(-)	0.962	0.897	cCCCCGcccccgct	Sp3
V\$KROX_Q6	5372	(+)	1.000	0.980	ccccCCCCCcgctc	KROX
V\$RFX1_Q2	5381	(+)	1.000	0.940	gcgtctccaggGCAACcg	RFX1

Annexes

VSPAX3_B	5389 (-)	0.815	0.835	agggcaacCGTGGctttcgat	Pax-3
VSKID3_01	5397 (-)	1.000	1.000	CGTGG	Kid3
VSSOX9_B1	5404 (-)	1.000	0.958	ttcgATTGTtactg	SOX9
VSREFX1_02	5409 (+)	0.982	0.961	ttgttactgtgGGAActg	RFX1
VSREFX1_02	5409 (-)	0.992	0.933	ttGTTACTgtgggaactg	RFX1
VSRBPJK_Q4	5416 (-)	1.000	0.988	tgtGGGAA	RBP-Jkappa
VSZF5_B	5458 (-)	0.922	0.931	caGCACGccacacg	ZF5
VSEGR1_01	5462 (-)	1.000	0.920	acgCCCACgcgc	Egr-1
VSKID3_01	5466 (+)	1.000	1.000	CCACG	Kid3

(b) Matrice « cellules immunes minimisant les faux positifs » (156 sites putatifs identifiés) :

matrix identifiant	position (strand)	core score	matrix score	sequence (always the (+)-strand is shown)	factor name
VSDR_Q3	97 (-)	0.956	0.929	tgtcccggttCCCC	VDR
VSGATA_Q6	304 (-)	1.000	1.000	cTTATCt	GATA
VSTAL1BETA47_01	419 (+)	1.000	0.938	gcgcaCAGATgctgag	Tal-1beta:E47
VSTAL1ALPHA47_01	419 (+)	1.000	0.947	gcgcaCAGATgctgag	Tal-1alpha:E47
VSTAT_Q6	516 (-)	1.000	0.993	tccCAGAAaccct	STAT
VSLEF1_Q2	533 (-)	1.000	1.000	CTTTGa	LEF1
VSNFAT1_Q6	585 (+)	1.000	1.000	GGAAaA	NFAT1
VSDR_Q3	615 (+)	1.000	0.925	GGGTGgtgggggaga	VDR
VSMZF1_Q5	710 (-)	1.000	1.000	cTCCCCa	MZF1
VSFOXO4_Q2	1098 (-)	1.000	0.911	gaaggaaACAAacag	FOXO4
VSCREBP1CJUN_01	1175 (+)	1.000	0.891	tGACGTct	ATF2: c-Jun
VSTAT_Q6	1179 (+)	1.000	0.999	gtctcTTCTGgga	STAT
VSCETS1P54_Q3	1232 (+)	1.000	0.979	tactcCGGAAGtgcc	c-Ets-1 p54
VSCETS1P54_Q2	1233 (+)	1.000	0.985	actcCGGAAGtg	c-Ets-1(p54)
VSCETS1P54_Q1	1235 (+)	1.000	0.995	tCCGGAagtg	c-Ets-1(p54)
VSDR3_Q4	1318 (+)	1.000	0.868	cccgacactccTGACcccg	VDR, CAR, PXR
VSSP1_Q6	1331 (-)	1.000	0.966	acccCGCCcaaca	SP1
VSSP1_Q4_01	1331 (-)	1.000	0.979	acccCGCCcaaca	SP1
VSSP1_Q6_01	1332 (-)	1.000	0.974	cccCGCCca	SP1
VSSP1_Q2_01	1333 (+)	1.000	0.979	ccCGCCcac	SP1
VSEGR2_01	1335 (-)	1.000	0.918	ccgCCCAcaca	Egr-2
VSMAZR_01	1361 (+)	1.000	0.984	gggggGGGGgtcc	MAZR
VSMAP1A3_01	1366 (+)	0.856	0.910	gggggTcccc	MAPK3 (p50)
VSMAP1A3_01	1366 (-)	1.000	0.917	gggggTCCCC	MAPK3 (p50)
VSMAP1_Q2_01	1565 (-)	1.000	0.992	ccggctgAGTCA	AP-1
VSMAP1_Q1	1567 (+)	1.000	0.974	ggctgAGTCAccg	AP-1
VSMAP1_Q1	1567 (-)	0.968	0.970	ggcTGAGTcaaccg	AP-1
VSMAP_Q6_01	1567 (+)	1.000	0.983	ggctgAGTCAc	MAF
VSMAP1FJ_Q2	1568 (-)	1.000	0.993	gctgaGTCAcc	AP-1
VSMAP1_Q2	1568 (-)	1.000	0.984	gctgaGTCAcc	AP-1
VSMAP1_Q6	1568 (-)	1.000	0.999	gctgaGTCAcc	AP-1
VSMAP1_Q4	1568 (-)	1.000	0.996	gctgaGTCAcc	AP-1
VSMAP1_C	1569 (+)	1.000	0.982	ctgAGTCAc	AP-1
VSMAP1_C	1569 (-)	0.989	0.991	cTGAGTcac	AP-1
VSMAP1_Q6_01	1569 (-)	1.000	0.997	ctgAGTCAc	AP-1
VSMZF1_Q2	1579 (+)	1.000	0.960	ggcgAGGGGcag	MZF1
VSMZF1_Q5	1787 (-)	1.000	1.000	cTCCCCa	MZF1
VSPU1_Q4	1825 (-)	1.000	0.923	caaagAGGAAaaccggagc	PU.1
VSNFAT1_Q6	1831 (+)	1.000	1.000	GGAAaA	NFAT1
VSEBF_Q6	1859 (-)	1.000	0.969	tctctAGGGaA	EBF
VSLEF1_Q2	1977 (-)	1.000	1.000	CTTTGa	LEF1
VSETS2_B	2008 (+)	1.000	0.917	agcAGGAAGgcatt	c-Ets-2
VSETS1_B	2009 (+)	1.000	0.940	gcAGGAAGgcatttg	c-Ets-1
VSETS2_Q6	2010 (-)	1.000	1.000	caGGAAG	ETS2
VSHANDIE47_01	2084 (-)	1.000	0.944	aaatCCAGActatgca	Hand1:E47
VSDR3_Q4	2098 (+)	1.000	0.839	cagggcctctcTGACccatc	VDR, CAR, PXR
VSDR_Q3	2100 (-)	1.000	0.910	gggcctctctGACCC	VDR
VSGATA_Q2	2121 (-)	1.000	0.983	ttTTATCttt	GATA-3
VSCETS1P54_Q3	2272 (-)	0.988	0.962	ccccacATCCGctccc	c-Ets-1 p54
VSMZF1_Q5	2283 (-)	1.000	1.000	cTCCCCa	MZF1
VSCETS1P54_Q3	3063 (-)	1.000	0.956	ccgctcTTCCGgcat	c-Ets-1 p54
VSMZF1_Q5	3092 (-)	1.000	1.000	cTCCCCa	MZF1
VSMZF1_Q5	3532 (+)	1.000	1.000	tGGGGAg	MZF1
VSDR_Q3	3541 (-)	0.953	0.933	tggcccaactTCCCC	VDR
VSOLF1_Q1	3719 (-)	0.961	0.919	ccaggcccccaCGGGAgtccag	Olf-1
VSPU1_Q6	3741 (-)	1.000	1.000	CTTCctct	PU.1
VSCREBP1CJUN_01	3813 (-)	1.000	0.891	aaACGTCA	ATF2: c-Jun
VSTAT3_Q1	3816 (+)	0.675	0.807	cgtcaGGTCCaggaactgag	STAT3
VSMZF1_Q2	3832 (+)	1.000	0.985	tgaggAGGGGgaa	MZF1
VSTAT1_Q1	3953 (+)	0.817	0.845	ccgcggttcCGGAAagttaac	STAT1
VSTAT1_Q1	3953 (-)	0.954	0.878	ccgcggtTCCGGAagttaac	STAT1
VSP1_Q1	4008 (-)	1.000	0.975	accCGCCgc	SP1
VSKROX_Q6	4024 (+)	1.000	0.959	cgcgCCCCctctc	KROX
VSTATA_Q1	4077 (+)	1.000	0.977	ctATAAAtagccct	TATA
VSNFAT1_Q6	4091 (-)	1.000	1.000	tTTTCC	NFAT1
VSTATA_Q1	4189 (+)	1.000	0.998	ctATAAAGccgcgcg	TATA
VSKROX_Q6	4357 (-)	1.000	0.952	gggatGGGGGcga	KROX
VSDR3_Q4	4370 (-)	0.907	0.848	acgggGGGCAcgggggtcccc	VDR, CAR, PXR
VSPPARA_Q2	4372 (+)	0.823	0.841	gggGGGCAcgggggtcccc	PPARalpha:RXRalpha
VSDR_Q3	4374 (+)	0.956	0.915	GGGGCaccggggtcc	VDR
VSLMO2COM_01	4433 (-)	1.000	0.999	cagcACCTGccg	Lmo2 complex
VSE12_Q6	4433 (-)	1.000	0.990	cagcACCTGcc	E12
VSE2A_Q6	4436 (+)	1.000	1.000	CACCTgcc	E2A
VSMAZR_01	4502 (-)	1.000	0.980	agaCCCCCcccg	MAZR
VSTAT3_Q3	4539 (+)	0.990	0.932	tctcccAGGAAGtga	STAT3
VSKROX_Q6	4581 (+)	1.000	0.959	cgcgCCCCctctc	KROX
VSMAP1_Q1	4610 (+)	0.968	0.970	cgggtACTCAgac	AP-1
VSMAP1_Q1	4610 (-)	1.000	0.974	cggTGACTcagcc	AP-1
VSMAP1FJ_Q2	4611 (+)	1.000	0.993	ggTGACTcagc	AP-1
VSMAP1_Q2	4611 (+)	1.000	0.984	ggTGACTcagc	AP-1
VSMAP1_Q6	4611 (+)	1.000	0.999	ggTGACTcagc	AP-1
VSMAP1_Q4	4611 (+)	1.000	0.996	ggTGACTcagc	AP-1

Annexes

V\$AP1_C	4612 (+)	0.989	0.991	gtgACTCAg	AP-1
V\$AP1_C	4612 (-)	1.000	0.982	gTGACTcag	AP-1
V\$AP1_Q6_01	4612 (+)	1.000	0.997	gTGACTcag	AP-1
V\$MAF_Q6_01	4612 (-)	1.000	0.983	gTGACTcagcc	MAF
V\$AP1_Q2_01	4613 (+)	1.000	0.991	TGACTcagcctc	AP-1
V\$EGR2_01	4666 (-)	1.000	0.868	acgCCCAccccc	Egr-2
V\$SP1_Q6	4698 (-)	1.000	0.975	acccCGGCCcgc	SP1
V\$SP1_Q4_01	4698 (-)	1.000	0.982	acccCGGCCcgc	SP1
V\$SP1_Q6_01	4699 (-)	1.000	0.992	cccCGGCCcc	SP1
V\$SP1_Q2_01	4700 (+)	1.000	0.993	ccCGGCCcgc	SP1
V\$STAT1_01	4722 (-)	1.000	0.848	cgccctTCCCGgcaggtccc	STAT1
V\$STAT3_03	4723 (-)	1.000	0.970	gccccTCCCGgcagc	STAT3
V\$SP1_Q6	4809 (+)	1.000	1.000	ggggGGCGGggcc	SP1
V\$SP1_Q4_01	4809 (+)	1.000	0.999	ggggGGCGGggcc	SP1
V\$SP1_Q2_01	4810 (-)	1.000	1.000	gggGGCGGgg	SP1
V\$SP1_01	4811 (+)	1.000	0.971	ggGGCGGggc	SP1
V\$SP1_Q6_01	4811 (+)	1.000	1.000	ggGGCGGggc	SP1
V\$SP1_02	4811 (+)	1.000	0.995	gGGCGGggcc	SP1
V\$SP1_Q6	4832 (-)	1.000	0.998	cgccCGGCCcaca	SP1
V\$SP1_Q4_01	4832 (-)	1.000	0.997	cgccCGGCCcaca	SP1
V\$SP1_02	4832 (-)	1.000	0.999	cgccCGGCCc	SP1
V\$SP1_01	4833 (-)	1.000	0.971	gccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q6_01	4833 (-)	1.000	1.000	gccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q2_01	4834 (+)	1.000	1.000	ccCGGCCc	SP1
V\$EGR_Q6	4835 (-)	1.000	0.995	cccgCCCCac	Egr
V\$KROX_Q6	4835 (+)	1.000	0.985	cccgCCCCacgccc	KROX
V\$EGR3_01	4838 (-)	1.000	0.872	gccccCACGccc	Egr-3
V\$EGR2_01	4838 (-)	1.000	0.867	gccccCACgccc	Egr-2
V\$CETSIP54_03	4849 (+)	1.000	0.983	cccgCGGAAGtgccc	c-Ets-1 p54
V\$CETSIP54_01	4852 (+)	1.000	0.995	gCGGGAagt	c-Ets-1 (p54)
V\$LEF1_Q2	4877 (-)	1.000	1.000	CTTTGa	LEF1
V\$CREBP1CJUN_01	4880 (+)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$CREBP1CJUN_01	4880 (-)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$CREBP1CJUN_01	4896 (+)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$CREBP1CJUN_01	4896 (-)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$SP1_Q4_01	4928 (+)	1.000	0.970	gcccGGCGGggca	SP1
V\$SP1_Q6_01	4930 (+)	1.000	0.977	cgGGCGGggc	SP1
V\$DR3_Q4	4980 (-)	0.907	0.830	agccgGGGCAgccccggcgac	VDR, CAR, PXR
V\$SP1_01	5007 (-)	1.000	0.980	accCGGCCcg	SP1
V\$SP1_Q6	5102 (-)	1.000	0.986	ggccCGGCCcag	SP1
V\$SP1_Q4_01	5102 (-)	1.000	0.987	ggccCGGCCcag	SP1
V\$SP1_02	5102 (-)	1.000	0.995	ggccCGGCCc	SP1
V\$SP1_01	5103 (-)	1.000	0.971	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q6_01	5103 (-)	1.000	1.000	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q2_01	5104 (+)	1.000	0.990	ccCGGCCcaca	SP1
V\$KROX_Q6_01	5146 (+)	1.000	0.917	GGGGAacccc	KROX (p50)
V\$KROX_Q6_01	5146 (-)	0.856	0.910	ggggaCCCCC	KROX (p50)
V\$SP1_Q6	5172 (-)	1.000	0.999	ggccCGGCCcgcg	SP1
V\$SP1_Q4_01	5172 (-)	1.000	0.999	ggccCGGCCcgcg	SP1
V\$SP1_02	5172 (-)	1.000	0.995	ggcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_01	5173 (-)	1.000	0.971	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q6_01	5173 (-)	1.000	1.000	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q2_01	5174 (+)	1.000	1.000	ccCGGCCc	SP1
V\$KROX_Q6	5175 (+)	1.000	0.963	cccgCCCCGggccc	KROX
V\$YY1_Q2	5230 (+)	1.000	0.872	gcgcccGCATcgggcgccc	YY1
V\$OLF1_01	5252 (+)	0.990	0.892	tccgggTCCCTaggggctgcga	Olf-1
V\$SP1_Q6	5309 (-)	1.000	0.977	cgcccCGGCCcgc	SP1
V\$SP1_Q4_01	5309 (-)	1.000	0.980	cgcccCGGCCcgc	SP1
V\$SP1_Q6_01	5310 (-)	1.000	0.977	gcccCGGCCcg	SP1
V\$KROX_Q6	5312 (+)	0.928	0.940	cccgCCCGCcccc	KROX
V\$KROX_Q6	5316 (+)	1.000	0.948	cccgCCCCCcgcg	KROX
V\$CREBP1CJUN_01	5334 (+)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$CREBP1CJUN_01	5334 (-)	1.000	1.000	tGACGTca	ATF2: c-Jun
V\$SP1_01	5341 (-)	1.000	0.967	agcCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q6	5369 (-)	1.000	0.998	cgcccCGGCCcgcg	SP1
V\$SP1_Q4_01	5369 (-)	1.000	0.997	cgcccCGGCCcgcg	SP1
V\$SP1_02	5369 (-)	1.000	0.999	cgcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_01	5370 (-)	1.000	0.971	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q6_01	5370 (-)	1.000	1.000	gcccCGGCCc	SP1
V\$SP1_Q2_01	5371 (+)	1.000	1.000	ccCGGCCc	SP1
V\$KROX_Q6	5372 (+)	1.000	0.980	cccgCCCCGcgctc	KROX
V\$EGR1_01	5462 (-)	1.000	0.920	acgCCCAcgcgc	Egr-1
V\$EGR3_01	5462 (-)	1.000	0.980	acgCCCAcgcgc	Egr-3
V\$EGR2_01	5462 (-)	1.000	0.948	acgCCCAcgcgc	Egr-2

Annexe 2 : Résultats du séquençage de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 et alignement des séquences clonées à la séquence de référence « refNT_010718.16 | Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly »

Le brin du dessus représente la séquence clonée dans le pSKoriTKan ; le brin du dessous représente la séquence de référence. Les substitutions ou insertions/délétions dans la séquence amplifiée par PCR par rapport à la séquence de référence sont surlignées en gris.

Clone 2

Score = 3707 bits (2007), Expect = 0.0 Identities = 2021/2027 (99%), Gaps = 3/2027 (0%)

TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTCCGGCCATGCCTTG	Query 46
	105
TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTCCGGCCATGCCTTG	Sbjct 1559024
CACAGCCCTCCCATCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTAGACCC	1558965 Query 106
	165
CACAGCCCTCCCATCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTAGACCC	Sbjct 1558964
TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCGCTCCCAACCA	1558905 Query 166
	225
TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCGCTCCCAACCA	Sbjct 1558904
GGGGAAGTGGCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	1558845 Query 226
	285
GGGGAAGTGGCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	Sbjct 1558844
CTTCTCCAGGAAACCGTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTGGCCAAGCTGCTGGTC	1558785 Query 286
	345
CTTCTCCAGGAAACCGTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTGGCCAAGCTGCTGGTC	Sbjct 1558784
TCCTTCACTCTCTATTACCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT	1558725 Query 346
	405
TCCTTCACTCTCTATTACCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT	Sbjct 1558724
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC	1558665 Query 406
	465
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC	Sbjct 1558664
CCTTGCTGAGGCTGCCATTCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	1558605 Query 466
	525
CCTTGCTGAGGCTGCCATTCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	Sbjct 1558604
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAATTCTCT	1558545 Query 526
	585
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAATTCTCT	Sbjct 1558544
GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	1558485 Query 586
	645
GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	Sbjct 1558484
CAGGCCAGGTTCTCTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	1558425 Query 646
	705
CAGGCCAGGTTCTCTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	Sbjct 1558424
TCCCGGCCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC	1558365 Query 706
	765
TCCCGGCCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC	Sbjct 1558364
CTCTCTGCCCCACCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGC GG GTGT	1558305 Query 766
	825
CTCTCTGCCCCACCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGC GG GTGT	Sbjct 1558304
GACGGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAAGTGAAGAGGGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGAC	1558245 Query 826
	885
GACGGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAAGTGAAGAGGGGGG-AAGGGGCTGCCACGTGAAGAC	Sbjct 1558244
CCCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCGCGC	1558186 Query 886
	945
CCCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCGCGC	Sbjct 1558185
CCCTCCGCGCCGCTCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCTTGTCGG	1558126 Query 946
	1005
CCCTCCGCGCCGCTCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCTTGTCGG	Sbjct 1558125
CTGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCCGCCGCGCTTCCGCGCCCCCTCTCCCTCC	1558066 Query 1006
	1065
CTGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCCGCCGCGCTTCCGCGCCCCCTCTCCCTCC	Sbjct 1558065
CGGTGCGCTCGGTCCCCACCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCATTTC	1558006 Query 1066
	1125
CGGTGCGCTCGGTCCCCACCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCATTTC	Sbjct 1558005
TAAATTCCCCGCTGACGTGCGCAGCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCGCGCATGAATGA	1557946 Query 1126
	1185
TAAATTCCCCGCTGACGTGCGCAGCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCGCGCATGAATGA	Sbjct 1557945
GCCGCCGACAGTACTACGCGCGCTATAAAGCCGCGCGCGCCAGGCTGCGGGAG	1557886 Query 1186
	1245
GCCGCCGACAGTACTACGCGCGCTATAAAGCCGCGCGCGCCAGGCTGCGGGAG	Sbjct 1557885
GCGACCGGCGAGTGGCGACGCGCGCCGCGAGGTAAGCGGGACGACCGCGGAGGGA	1557826 Query 1246
	1305

Annexes

	Sbjct	1557825	
GGGACCGGGCAGTGGCGACGCGGCCCGCCAGGTAAGCGGGACGGACCGCGGAGGGA	1557766	Query	1306
CAGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGCAGGCGGGTGGGGCGG	1365		
	Sbjct	1557765	
CAGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGCAGGCGGGTGGGGCGG	1557706	Query	1366
CCCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGA	1425		
	Sbjct	1557705	
CCCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGA	1557646	Query	1426
ACCGGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACTGCCGGCGCCCGATGGACACGCAG	1485		
	Sbjct	1557645	
GCGGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCGATGGACACGCAG	1557586	Query	1486
CTACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCGGCTTCTTG	1544		
	Sbjct	1557585	
CTACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCGGCTTCTTG	1557526	Query	1545
GGGCTCCTGCGCCATTCTCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCAGGAGACGC	1604		
	Sbjct	1557525	
GGGCTCCTGCGCCATTCTCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCAGGAGACGC	1557466	Query	1605
GCCCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGTGCCCGGGCCGGCTGAG	1664		
	Sbjct	1557465	
GCCCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGTGCCCGGGCCGGCTGAG	1557406	Query	1665
CGGGGGTGCGAGCGAGAGACGGACGCCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC	1724		
	Sbjct	1557405	
CGGGGGTGCGAGCGAGAGACGGACGCCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC	1557346	Query	1725
GCCCCGCTATGGCGTCGGGCGCCCCCTTCCCGGACAGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC	1784		
	Sbjct	1557345	
GCCCCGCTATGGCGTCGGGCGCCCCCTTCCCGGACAGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC	1557286	Query	1785
CCACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGCGGGGCTC	1844		
	Sbjct	1557285	
CCACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGCGGGGCTC	1557226	Query	1845
GCCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCCGCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA	1904		
	Sbjct	1557225	
-CCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCCGCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA	1557167	Query	1905
CGTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCGCGTGCTGCTGCGAGCGCCGGGCGGGGACAGG	1964		
	Sbjct	1557166	
CGTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCGCGTGCTGCTGCGAGCGCCGGGCGGGGACAGG	1557107	Query	1965
GCGGGAGACGCGAGGGGAGGCGGAGCAGCAGAGCCCCACGCGGGGCGAGCCGGGCGACCG	2024		
	Sbjct	1557106	
GCGGGAGACGCGAGGGGAGGCGGAGCAGCAGAGCCCCACGCGGGGCGAGCCGGGCGACCG	1557047	Query	2025
GGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT	2071		
	Sbjct	1557046	
GGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT	1557000		

Clone 6

Score = 3712 bits (2010), Expect = 0.0 Identities = 2022/2027 (99%), Gaps = 3/2027 (0%)

	Query	46
TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG	105	
	Sbjct	1559024
TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG	1558965	Query
CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTAGACCC	165	
	Sbjct	1558964
CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTAGACCC	1558905	Query
TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCGCTCCCAACCA	225	
	Sbjct	1558904
TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCGCTCCCAACCA	1558845	Query
GGGGAACCTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	285	
	Sbjct	1558844
GGGGAACCTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	1558785	Query
CTTCTCCAGGAAACCGTCTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC	345	
	Sbjct	1558784
CTTCTCCAGGAAACCGTCTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC	1558725	Query
TCCTTCACTCTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT	405	
	Sbjct	1558724
TCCTTCACTCTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT	1558665	Query
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC	465	
	Sbjct	1558664
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC	1558605	Query
CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	525	
	Sbjct	1558604
CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	1558545	Query
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAATTCTCT	585	
	Sbjct	1558544
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAATTCTCT	1558485	Query
GCGGTCCCTCGGCTCTCCAGCTCTGGGTGGTACCTGAATCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	645	
	Sbjct	1558484
GCGGTCCCTCGGCTCTCCAGCTCTGGGTGGTACCTGAATCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	1558425	Query
CAGGCCAGGTTCCCTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	705	
	Sbjct	1558424
CAGGCCAGGTTCCCTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	1558365	Query

Annexes

```

TCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC 765
||||| Sbjct 1558364
TCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC 1558305 Query 766
CTCTCCTGCCACCCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGT 825
||||| Sbjct 1558304
CTCTCCTGCCACCCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGT 1558245 Query 826
GACGGCAGAAACGTAGTCCAGGAAGTGGAGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC 885
||||| Sbjct 1558244
GACGGCAGAAACGTAGTCCAGGAAGTGGAGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC 1558185 Query 886
CCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCCGCGGCC 945
||||| Sbjct 1558184
CCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCCGCGGCC 1558125 Query 946
CCTCCGCGCCGCTCCCCGCGCCCCAGGCCCGCGGTTCGGAAGTTAACCCCTTGTCGGC 1005
||||| Sbjct 1558124
CCTCCGCGCCGCTCCCCGCGCCCCAGGCCCGCGGTTCGGAAGTTAACCCCTTGTCGGC 1558065 Query 1006
TGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCGCGCGCGCTTCCGCGCCCCCTCCTCCCTCCC 1065
||||| Sbjct 1558064
TGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCGCGCGCGCTTCCGCGCCCCCTCCTCCCTCCC 1558005 Query 1066
GGTCGCTCGGTCCCCACCCCGCGCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCCATTTCT 1125
||||| Sbjct 1558004
GGTCGCTCGGTCCCCACCCCGCGCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCCATTTCT 1557945 Query 1126
AAATTCCTCGCTGACGTGCGGACGCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGATGAATGAG 1185
||||| Sbjct 1557944
AAATTCCTCGCTGACGTGCGGACGCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGATGAATGAG 1557885 Query 1186
CCGCGGCACGAGTACTACGCGCGCTATAAAAGCCGCGCGCGGCCAGGCTGCGGGAGG 1245
||||| Sbjct 1557884
CCGCGGCACGAGTACTACGCGCGCTATAAAAGCCGCGCGCGGCCAGGCTGCGGGAGG 1557825 Query 1246
CGACCGGGCAGTGGCGACGCGCGCGCCAGGTAAGCGGGACGGACAGCCGCGGAGGGAC 1305
||||| Sbjct 1557824
CGACCGGGCAGTGGCGACGCGCGCGCCAGGTAAGCGGGACGGACAGCCGCGGAGGGAC 1557765 Query 1306
AGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGACGGCGCGGGTGGGGCGGC 1365
||||| Sbjct 1557764
AGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGACGGCGCGGGTGGGGCGGC 1557705 Query 1366
CCCTCCGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGACCGGGGTCCCTCGCGGCTGCGGAG 1425
||||| Sbjct 1557704
CCCTCCGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGACCGGGGTCCCTCGCGGCTGCGGAG 1557645 Query 1426
CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCAGCGCCGATGGACACGCAGC 1485
||||| Sbjct 1557644
CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGCGCGCCGATGGACACGCAGC 1557585 Query 1486
TACTTCGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCCCCGGCTTA-TTG 1544
||||| Sbjct 1557584
TACTTCGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCCCC-GGCTTTCTTG 1557526 Query 1545
GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGC 1604
||||| Sbjct 1557525
GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGC 1557466 Query 1605
GCCCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAG 1664
||||| Sbjct 1557465
GCCCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAG 1557406 Query 1665
CGGGGGTGTCAGGCGAGAGACGGACGCCACCCCGCTTCCCGGGCCCTCCTGGGACCCCC 1724
||||| Sbjct 1557405
CGGGGGTGTCAGGCGAGAGACGGACGCCACCCCGCTTCCCGGGCCCTCCTGGGACCCCC 1557346 Query 1725
GCCCCGATGGGCTCGGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC 1784
||||| Sbjct 1557345
GCCCCGATGGGCTCGGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC 1557286 Query 1785
CCACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGGCGGGGCTC 1844
||||| Sbjct 1557285
CCACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGGCGGGGCTC 1557226 Query 1845
GCCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCCGCGGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA 1904
||||| Sbjct 1557225
-CCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCCGCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA 1557167 Query 1905
CGTCACGGCCCTCTGACGTAGGGGCGCGTGCCTGGTGCAGAGCGCGGGGCGGGGACAG 1964
||||| Sbjct 1557166
CGTCACGGCCCTCTGACGTAGGGGCGCGTGCCTGGTGCAGAGCGCGGGGCGGGGACAG 1557107 Query 1965
GCGGGAGACGACAGGGGAGGCGGAGCAGAGAGCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGGACCG 2024
||||| Sbjct 1557106
GCGGGAGACGACAGGGGAGGCGGAGCAGAGAGCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGGACCG 1557047 Query 2025
GGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2071
||||| Sbjct 1557046
GGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 1557000

```

Clone 14

Score = 3718 bits (2013), Expect = 0.0 Identities = 2022/2026 (99%), Gaps = 1/2026 (0%)

Query 47

```

TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG 106
||||| Sbjct 1559024
TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG 1558965 Query 107
CACAGCCCTCCCATCTCTGGTCCAGTCTCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC 166
||||| Sbjct 1558964
CACAGCCCTCCCATCTCTGGTCCAGTCTCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC 1558905 Query 167

```

Annexes

TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCCGCTCCCAACCA	226		
	Sbjct	1558904	
TTCTTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCTCCGCTCCCAACCA	1558845	Query	227
GGGGAAC TGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	286		
	Sbjct	1558844	
GGGGAAC TGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA	1558785	Query	287
CTTCTCCAGGAACCGTCTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC	346		
	Sbjct	1558784	
CTTCTCCAGGAACCGTCTCTCTCATCCCTGGGGGCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC	1558725	Query	347
TCCTTCACTCTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTACCACAAATGGT	406		
	Sbjct	1558724	
TCCTTCACTCTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT	1558665	Query	407
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCTCTCTC	466		
	Sbjct	1558664	
CCGAAGGTGGGTCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCTCTCTC	1558605	Query	467
CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	526		
	Sbjct	1558604	
CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCAGCTCCCTC	1558545	Query	527
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAACTTCTC	586		
	Sbjct	1558544	
ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCACCTTCCCCAACTTCTCT	1558485	Query	587
GCGTCTCTCGGGTCTCCAGCTCTGGGTGGTACCTGAATCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	646		
	Sbjct	1558484	
GCGTCTCTCGGGTCTCCAGCTCTGGGTGGTACCTGAATCCCGCTGGGCCTTCCCTCC	1558425	Query	647
CAGGCCAGGTTCTTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	706		
	Sbjct	1558424	
CAGGCCAGGTTCTTCCGCTAAAGACTCTGGGCTACTTTGGGCTCCCTACTCTTCTTC	1558365	Query	707
TCCCGGCCCCCAGGCCACAGCCCTCGTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC	766		
	Sbjct	1558364	
TCCCGGCCCCCAGGCCACAGCCCTCGTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC	1558305	Query	767
CTCTCTGCCACCTTGAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGC GGGGTGT	826		
	Sbjct	1558304	
CTCTCTGCCACCTTGAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGC GGGGTGT	1558245	Query	827
GACGGCAGAAACGTAGTCCAGGAAC TGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC	886		
	Sbjct	1558244	
GACGGCAGAAACGTAGTCCAGGAAC TGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC	1558185	Query	887
CCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCGCGCC	946		
	Sbjct	1558184	
CCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCGCGCC	1558125	Query	947
CCTCCGCGCCGCTCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAGTTAACCCCTTGTCGGC	1006		
	Sbjct	1558124	
CCTCCGCGCCGCTCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAGTTAACCCCTTGTCGGC	1558065	Query	1007
TGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCCGCGCGGCTTCCGCGCCCCCTCTCCCTCCC	1066		
	Sbjct	1558064	
TGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCCGCGCGGCTTCCGCGCCCCCTCTCCCTCCC	1558005	Query	1067
GGTCGCTCGGTCCCCACCCCCGCGCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCCATTTCT	1126		
	Sbjct	1558004	
GGTCGCTCGGTCCCCACCCCCGCGCTCGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCCATTTCT	1557945	Query	1127
AAATTCCCGCTGACGTGGCAGCGCGTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGATGAATGAG	1186		
	Sbjct	1557944	
AAATTCCCGCTGACGTGGCAGCGCGTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGATGAATGAG	1557885	Query	1187
CCGCGGCACGAGTACTACGCGCCCTATAAAAGCCGCGCGCGGCCAGGCTGCGGGAGG	1246		
	Sbjct	1557884	
CCGCGGCACGAGTACTACGCGCCCTATAAAAGCCGCGCGCGGCCAGGCTGCGGGAGG	1557825	Query	1247
CGACCGGGCAGTGGCGACGCGGCCCGCCAGGTAAGCGGGACGGACAGCCGCGGAGGGAC	1306		
	Sbjct	1557824	
CGACCGGGCAGTGGCGACGCGGCCCGCCAGGTAAGCGGGACGGACAGCCGCGGAGGGAC	1557765	Query	1307
AGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGACGGCGCGGGTGGGGCGGC	1366		
	Sbjct	1557764	
AGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGACGGCGCGGGTGGGGCGGC	1557705	Query	1367
CCCTCCGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGACCGGGGTCCCTTCGCGGCTGCGGAG	1426		
	Sbjct	1557704	
CCCTCCGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGACCGGGGTCCCTTCGCGGCTGCGGAG	1557645	Query	1427
CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGCGCCCCGATGGACACGCAGC	1486		
	Sbjct	1557644	
CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGCGCCCCGATGGACACGCAGC	1557585	Query	1487
TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCGGCTTCTTGG	1546		
	Sbjct	1557584	
TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCGGCTTCTTGG	1557525	Query	1547
GGCTCCTGCGCCATTCTCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGCG	1606		
	Sbjct	1557524	
GGCTCCTGCGCCATTCTCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGCG	1557465	Query	1607
CCCCCTCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAGC	1666		
	Sbjct	1557464	
CCCCCTCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAGC	1557405	Query	1667
GGGGGTGCAGGCGAGAGACGGCGCCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCTGGGACCCCGG	1726		
	Sbjct	1557404	
GGGGGTGCAGGCGAGAGACGGAGCGCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCTGGGACCCCGG	1557345	Query	1727
CCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCC	1786		
	Sbjct	1557344	
CCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCC	1557285	Query	1787
CACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGCGGGGCTCTC	1846		
	Sbjct	1557284	
CACGGCTTCCCGCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCTCAGGACCGGGGGGCGGGGCTCTC	1557226	Query	1847
CCAGGTCCCGCCCCCGCCCCACGCCCGCGCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGAC	1906		
	Sbjct	1557225	
CCAGGTCCCGCCCCCGCCCCACGCCCGCGCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGAC	1557166	Query	1907

Annexes

```
GTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGGGCAGGG 1966
||||| Sbjct 1557165
GTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGGGCAGGG 1557106 Query 1967
CGGGAGACGCAGGGGAGGCGGAGCAGCAGAGCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCGG 2026
||||| Sbjct 1557105
CGGGAGACGCAGGGGAGGCGGAGCAGCAGAGCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCGG 1557046 Query 2027
GGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2072
||||| Sbjct 1557045
GGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 1557000
```

[illegible]